



**ANA PAULA
CARTEIRO
CONDE PEREIRA**

**CULTURA *IN VITRO* DO ULMEIRO
(*Ulmus minor* Mill.)**



**ANA PAULA
CARTEIRO
CONDE PEREIRA**

**CULTURA *IN VITRO* DO ULMEIRO
(*Ulmus minor* Mill.)**

tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia, realizada sob a orientação científica da Dr.^a Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT e do FSE no
âmbito da intervenção operacional
Praxis XXI (referência Praxis
XXI/BD/3152/94)

No largo da rua onde nasci havia um olmo. Quantas vezes aquele olmo testemunhou as minhas brincadeiras de criança, quando eu ia passar as férias de verão à aldeia. Num desses verões, um dos grandes ramos do olmo começou a murchar. Lembro-me que as pessoas da aldeia culpavam, pelo sucedido, um condutor que costumava colocar o seu camião à sombra daquela majestosa árvore, para se proteger do tórrido calor transmontano. No ano seguinte, o olmo acabou por morrer. O 'Largo do Olmo' subsiste mas, no seu centro, existe agora uma árvore que nunca conseguirá alcançar o encanto do seu antecessor.

o júri

presidente

Professor Doutor Jorge Ribeiro Frade
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Olinda da Conceição Pinto Carnide
Professora Catedrática do Departamento de Genética e Biotecnologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares
Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Ana Dias Monteiro Santos
Professora Catedrática do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto
Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra

Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (orientadora)

agradecimentos

Para além de muitas outras pessoas que indirectamente prestaram algum tipo de ajuda gostaria, sinceramente, de agradecer às seguintes:

À Prof Dr.^a Conceição Santos - que para mim, desculpem o abuso, é a São - agradeço o apoio que sempre me deu ao longo destes anos. À São eu agradeço, principalmente, as suas críticas construtivas, as sugestões e os conselhos que me deu, mesmo quando a ligação que tinha com este trabalho era apenas a da amizade para com quem o realizava. Posteriormente, essa ligação modificou-se e, em relação a isso, tenho de agradecer a confiança que demonstrou ao aceitar como orientadora uma tese que não tinha direccionado. A São sabe a estima que eu tenho para com ela e o quanto a nossa amizade é importante para mim!

À Alexandra Sousa, minha colega durante a execução prática desta tese. A ela agradeço especialmente o apoio, a companhia e a boa disposição que sempre nos deu alento nos dias mais difíceis. `A Xana agradeço todo o trabalho que foi realizado em parceria e que assim se tornou mais fácil de executar. Finalmente agradeço a amizade que nos liga já há tantos anos.

À D. Maria José agradeço a amizade e simpatia mas, principalmente, agradeço todo o trabalho por ela realizado no manuseamento e lavagem, à mão, dos recipientes para a cultura *in vitro* que, em determinadas alturas, “eram mais que muitos”.

Ao Armando agradeço a disponibilidade constante na resolução de problemas no laboratório e, muito em particular, o trabalho insubstituível que realizou na aclimatização das plantas.

À Glória agradeço a companhia e amizade durante o trabalho que realizámos em paralelo. A ela agradeço também o tempo e o trabalho dispendidos na subcultura de algum material vegetal, após a minha saída do laboratório para a manuscricção da tese.

Ao Prof. Doutor Calado e à Doutora Sandra agradeço a ajuda e explicações de funcionamento do aparelho de ponto crítico e, também, os ensinamentos na técnica de microscopia electrónica de varrimento.

agradecimentos

À D. Hélia agradeço as explicações e apoio instrumental na microscopia óptica.

À Doutora Violante agradeço a disponibilidade e auxílio prestado na execução das fotografias de microscopia electrónica de varrimento.

Ao Engenheiro Quadros, da Mata Nacional do Choupal, e a toda a sua equipa agradeço a disponibilidade e a ajuda prestadas na colheita do material.

À Engenheira Alda Vieira, da Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, agradeço o facto de ter disponibilizado o terreno para a plantação dos ulmeiros.

Ao Nuno e à Mónica, que foram alunos de seminário no sector de Fisiologia Vegetal, agradeço a ajuda prestada em alguns ensaios.

À Salomé, à Helena e à Rosinha agradeço o auxílio no esclarecimento de dúvidas pontuais.

À Gina, uma amiga de tantos anos, agradeço a disponibilidade que tem sempre para comigo.

Aos meus pais agradeço todo o esforço que fizeram para me proporcionarem uma educação condigna e uma boa formação académica. A eles agradeço, muito em especial, todo o mimo e carinho e toda a atenção e compreensão que sempre me disponibilizaram nos momentos difíceis. Ao meu irmão agradeço o amor que sempre nos uniu.

Ao Jorge agradeço o apoio incondicional e o incentivo que manifestou desde o início desta tese. A ele agradeço a compreensão e a paciência que teve para comigo ao longo de todos estes anos. Agradeço-lhe ainda as sugestões e as longas horas de trabalho imprescindível à realização da parte gráfica da tese.

Ao Sr. José e à D. Adelaide, agradeço a compreensão e o apoio que sempre me deram ao tomarem conta do João e da Inês.

Por fim, agradeço ao João e à Inês o facto de terem despertado em mim o maior dos sentimentos, o amor de mãe.

palavras-chave

Calo, cultura *in vitro*, cultura de segmentos nodais, embrião somático, embriogénese secundária, embriogénese somática, embriogénese repetitiva, grafiose do ulmeiro, organogénese, isolamento e cultura de protoplastos, regeneração de rebentos, reguladores de crescimento, ulmeiro, Ulmaceae, *Ulmus minor*.

resumo

O ulmeiro que predomina em Portugal (*Ulmus minor* Mill.), é uma árvore de extrema importância como ornamental e como fornecedora de madeira de excelente qualidade. Infelizmente, desde o início do século passado, a grafiose dos ulmeiros ou DED ("Dutch Elm Disease") está a provocar uma devastadora mortandade tendo o número de ulmeiros diminuído drasticamente por todo o Hemisfério Norte. Esta catástrofe desencadeou uma intensa pesquisa que incidiu na obtenção de híbridos tolerantes à doença e no controlo desta. Os resultados obtidos não recompensaram o investimento realizado. A conservação e a melhoria dos ulmeiros continua assim a ser uma prioridade dada a perda de variabilidade genética que surge como consequência do seu desaparecimento. A cultura *in vitro* é uma área que permite a concretização destes objectivos, uma vez que possibilita a multiplicação e conservação de genótipos importantes mas também a sua melhoria através, por exemplo, da fusão de protoplastos. Actualmente, defende-se ainda que o estabelecimento de um sistema eficiente de regeneração de plantas é indispensável na recuperação de clones/indivíduos conservados pelo frio, dado que a preservação de colecções de ulmeiros em campo é muito dispendiosa. Protocolos de introdução *in vitro* foram já desenvolvidos para algumas espécies de *Ulmus*. No entanto, o ulmeiro exibe uma grande variedade de respostas no que respeita ao seu cultivo *in vitro* pelo que, para um determinado genótipo, é frequente ser necessário desenvolver um particular sistema de cultura. Por todas estas razões, o estudo sobre a cultura *in vitro* do ulmeiro existente em Portugal era importante e inadiável.

A cultura *in vitro* de *U. minor* foi iniciada com o estabelecimento de um protocolo de proliferação de rebentos, a partir de várias árvores, utilizando um meio com a constituição base de DKW. Após uma fase de enraizamento *in vitro* ou em solo, as plantas aclimatizadas foram transferidas para o campo. Foram também obtidas plantas por produção adventícia de rebentos em calo e folhas. Na presença de 1 mg/l de BAP foram obtidos rebentos via organogénese indirecta em calo e, nas folhas, foram obtidos rebentos por via directa e indirecta.

Numa segunda fase, foram isolados protoplastos a partir de folhas e de calo, usando uma série de combinações de enzimas hidrolíticas. Os protoplastos de folha *in vitro* foram cultivados usando vários métodos, tendo o método de cultura em gotas de agarose promovido a formação de colónias e de microcalos. Pela primeira vez, o meio KM foi usado com sucesso no cultivo de protoplastos de folha de ulmeiro.

resumo (cont.)

Finalmente, foram ensaiados protocolos para o estabelecimento de culturas embriogénicas.

Sendo a embriogénese somática uma das vias mais lucrativas de regeneração de plantas, esta enquadra-se na estratégia actual adoptada para o ulmeiro como uma inegável mais valia. Uma vez que este tipo de cultura ainda não tinha sido estabelecido a partir de material adulto do género *Ulmus*, o seu estudo era fundamental e foi abordado com especial interesse e detalhe. O protocolo que se mostrou mais eficiente foi aquele que envolveu o uso de folhas jovens *in vitro* que foram colocadas em meio MS com 2,4-D e cinetina, no escuro, durante oito semanas. Nestas condições obteve-se um calo embriogénico a partir do qual se formaram as estruturas embriogénicas.

Os protocolos de cultura *in vitro* do ulmeiro, estabelecidos nesta tese, fornecem assim uma imprescindível base de trabalho em futuros programas de conservação e melhoramento da população Portuguesa de ulmeiros.

keywords

Callus, dutch elm disease, elm, *in vitro* culture, node segments culture, organogenesis, plant growth regulators, protoplasts isolation and culture, shoot regeneration, secondary embryogenesis, somatic embryogenesis, somatic embryos, Ulmaceae, *Ulmus minor*.

abstract

The elm tree that predominates in Portugal (*Ulmus minor* Miill.) is important both as ornamental and as a timber supplier of excellent quality. Unfortunately, DED (Dutch Elm Disease) has been the cause of a catastrophic drop in the number of elms in all the Northern Hemisphere, since the beginning of the 20th century. This catastrophe has led to an intense research about, in one way, the control of the disease and in another way in the production of tolerant hybrids. Despite this intense research, the results do not reward the performed investment. The goals of elm preservation and improvement remain regarding the genetic losses due to elm disappearance. *In vitro* culture is an area that allows the concretization of these goals since it permits the multiplication and preservation of important genotypes and also their improvement by, for example, protoplast fusion. Actually, the establishment of an efficient system of plant regeneration is also defended as indispensable in the recuperation of clones/genotypes cryopreserved, since the maintenance of elm collections in the field is very expensive. Micropropagation protocols had already been developed for some species of *Ulmus*. However, there is a great genotypic variety concerning elm's *in vitro* culture and often, for one determined genotype, it is necessary to develop a particular system of culture. For these reasons, the study of *in vitro* culture of the elm from Portugal was very important and undelayable.

Ulmus minor in vitro culture was initiated by the establishment of a protocol for proliferation of shoots, from various trees, using a medium with the basal constitution of DKW. After a rooting stage *in vitro* or in soil, the acclimatized plants were transferred to the field. Plants were also produced by adventitious regeneration of shoots in callus and leaves. In the presence of 1 mg/l of BAP shoots were produced through indirect organogenesis in callus and, in leaves, shoots were produced via direct and indirect organogenesis.

In a second phase, protoplasts were isolated from leaves and callus using a series of hydrolytic enzymes combinations. *In vitro* leaf protoplasts were cultivated following some methods of culture, and the method of culture in agarose droplets promoted the production of colonies and microcalli. For the first time, KM medium was used with success in the culture of elm leaf protoplasts.

abstract (cont.)

Finally, protocols for the establishment of embryogenic cultures had been experimented.

Since somatic embryogenesis is one of the most advantageous ways of plant regeneration, it fits in the current elm's strategy as an undeniable value. Until now, this type of culture had not been developed from adult material of any species of the *Ulmus* genus. Because of this, its study was indispensable and was boarded with special interest and detail. The protocol that showed most efficient involved the use of young *in vitro* leaves that were placed in MS medium with 2,4-D and kinetin, in the dark, during eight weeks. In these conditions, an embryogenic callus was formed and from this callus embryogenic structures were produced.

The elm *in vitro* culture protocols, established in this thesis, provides an essential work base in future preservation and improvement programs of Portugal elm population.

abreviaturas

ABA	ácido abscísico
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIB	ácido indol 3-butírico
ANA	ácido naftalenoacético
B5	meio de Gamborg (1968)
BAP	benzilaminopurina
CGA	cultura em gotas de agarose
CML	cultura em meio líquido
CML/MS	cultura em meio líquido sobre meio sólido
CPW	sais inorgânicos de Power e Chapman (1985)
DAP	diâmetro à altura do peito
DED	Dutch Elm Disease
DKW	meio de Driver e Kuniyuki (1984)
e.p.g.s	embriões precocemente germinados
g p.f.	grama de peso fresco
IAA	ácido indol 3-acético
KM8p	meio 8p de Kao e Michayluk (1975)
Kn	cinetina
MES	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MEV	microscopia electrónica de varrimento
MS	meio de Murashige e Skoog (1962)
p.f.	peso fresco
PEG	polietilenoglicol
pp	protoplastos
PVP	polivinilpirrolidona
rcf	rebentos de caule fino e folhas pouco endurecidas
rcg	rebentos de caule grosso e folhas endurecidas
rpm	rotações por minuto
TDZ	tidiazuron

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Abreviaturas	xi
 Cap. 1 Introdução geral	
Sumário	2
1.1 O ulmeiro	3
1.2 O ulmeiro e a grafiose	5
1.2.1 O agente patogénico e o vector da grafiose do ulmeiro	5
1.2.2 Manifestação e caracterização da grafiose do ulmeiro	7
1.2.3 Estratégias de prevenção e tratamento da grafiose do ulmeiro	8
1.2.4 Estratégias de melhoramento e de conservação do ulmeiro	10
1.3 Ocorrência da grafiose do ulmeiro em Portugal	12
1.3.1 Descrição e caracterização do ulmeiro que predomina em Portugal	12
1.3.2 Descrição da evolução de grafiose em algumas zonas de Portugal	13
1.4 Biotecnologia do ulmeiro aliada às tentativas de controlo da grafiose	16
1.4.1 Cultura <i>in vitro</i> do ulmeiro	17
1.4.2 Razões para a cultura <i>in vitro</i> do ulmeiro Português e plano geral da tese	20
Referências bibliográficas	22
 Cap. 2 Produção de plantas por cultura de segmentos nodais	
Sumário	30
2.1 Introdução	31
2.2 Material e Métodos	33
2.2.1 Selecção do local e de árvores para colheita	33
2.2.2 Produção de rebentos a partir de segmentos distais e basais	34
2.2.2.1 Preparação dos explantes	34
2.2.2.2 Cultura de segmentos distais e basais	35
2.2.3 Enraizamento <i>in vitro</i> dos rebentos micropropagados	36
2.2.4 Aclimatização	37
2.2.4.1 Aclimatização de plantas enraizadas <i>in vitro</i>	37
2.2.4.2 Aclimatização directa de rebentos micropropagados	38

2.2.5 Análise estatística	38
2.3 Resultados	39
2.3.1 Produção de rebentos a partir de segmentos distais e basais	39
2.3.2 Enraizamento <i>in vitro</i> de rebentos	45
2.3.3 Aclimatização	49
2.3.3.1 Aclimatização de plantas enraizadas <i>in vitro</i>	49
2.3.3.2 Aclimatização directa de rebentos micropropagados	51
2.3.3.3 Transferência das plantas para o campo	53
2.4 Discussão e Conclusão	54
2.4.1 Produção de plantas a partir de segmentos distais e basais	54
2.4.2 Enraizamento <i>in vitro</i> de rebentos	56
2.4.3 Aclimatização	57
Referências bibliográficas	59

Cap. 3 Regeneração de rebentos por organogénese em calo e folhas

Sumário	64
3.1 Introdução	65
3.2 Material e Métodos	67
3.2.1 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta	67
3.2.1.1 Produção de calo a partir de folhas	67
3.2.1.2 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta a partir de calo	68
3.2.2 Regeneração de rebentos por organogénese em folhas	69
3.2.3 Análise estatística	71
3.3 Resultados	71
3.3.1 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta	71
3.3.1.1 Produção de calo a partir de folhas	71
3.3.1.2 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta a partir de calo	74
3.3.2 Regeneração de rebentos por organogénese em folhas	77
3.4 Discussão e Conclusão	80
3.4.1 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta	80
3.4.1.1 Produção de calo em folhas	80
3.4.1.2 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta a partir de calo	81
3.4.2 Regeneração de rebentos por organogénese em folhas	83
Referências bibliográficas	85

Cap. 4 Isolamento e cultura de protoplastos de *Ulmus minor* Mill.

Sumário	90
4.1 Introdução	91
4.2 Material e Métodos	92
4.2.1 Isolamento de protoplastos	92
4.2.1.1 Isolamento e purificação de protoplastos de calo	92
4.2.1.2 Isolamento e purificação de protoplastos de folha	93
4.2.1.3 Determinação do rendimento e da viabilidade dos protoplastos	96
4.2.2 Cultura de protoplastos de folha	97
4.2.2.1 Cultura em meio líquido (CML)	97
4.2.2.2 Cultura em meio líquido sobre meio sólido de agarose (CML/MS)	97
4.2.2.3 Cultura em gotas de agarose (CGA)	98
4.2.3 Análise estatística	99
4.3 Resultados e Discussão	100
4.3.1 Isolamento de protoplastos	100
4.3.1.1 Isolamento de protoplastos de calo	100
4.3.1.2 Isolamento de protoplastos de folha <i>in vitro</i>	101
4.3.1.2 Isolamento de protoplastos de folha de estufa	104
4.3.1.2 Viabilidade dos protoplastos	105
4.3.2 Cultura de protoplastos de folha	106
4.3.2.1 Cultura em meio líquido e em meio líquido sobre meio sólido de agarose	106
4.3.2.2 Cultura de protoplastos em gotas de agarose	109
4.4 Conclusão	112
Referências bibliográficas	113

Cap. 5 Embriogénese somática em folhas de *Ulmus minor* Mill.

Sumário	118
5.1 Introdução	119
5.1.1 Embriogénese somática	119
5.1.2 Factores que influenciam a embriogénese somática em lenhosas	120
5.1.3 Histodiferenciação, maturação, germinação e conversão	124
5.1.4 Embriogénese repetitiva	127
5.1.5 Objectivos	128
5.2 Material e Métodos	129

5.2.1 Produção de embriões globulares em calo embriogénico	129
5.2.1.1 Indução de calo embriogénico	129
5.2.1.2 Produção de embriões globulares	131
5.2.2 Alteração das condições do protocolo base de inoculação	132
5.2.2.1 Efeito da inoculação inicial das folhas à luz (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. luz)	132
5.2.2.2 Efeito da realização de mais cortes nas folhas (folhas com 6 a 9 cortes e 8 sem. escuro)	132
5.2.2.3 Influência da incubação permanente do calo embriogénico no escuro	133
5.2.3 Histodiferenciação dos embriões globulares	133
5.2.4 Obtenção de embriões precocemente germinados (e.p.g.s) em calo embriogénico	134
5.2.4.1 Obtenção de e.p.g.s após subcultura do calo embriogénico em meio líquido	134
5.2.4.2 Conversão dos e.p.g.s	135
5.2.4.3 Aclimatização de plantas obtidas de e.p.g.s	135
5.2.5 Embriogénese repetitiva a partir de embriões precocemente germinados (e.p.g.s)	136
5.2.5.1 Cultura dos e.p.g.s em meio basal	136
5.2.5.2 Determinação do número de embriões em calo embriogénico formado <i>de novo</i>	136
5.2.6 Observações em microscopia electrónica de varrimento (M.E.V.)	137
5.2.7 Análise estatística	137
5.3 Resultados	138
5.3.1 Produção de embriões globulares em calo embriogénico	138
5.3.1.1 Efeito do meio de indução e da idade dos rebentos na produção de calo	138
5.3.1.2 Resultados da indução de calo embriogénico nos meios I2 e I6	140
5.3.1.3 Confirmação da natureza do calo em microscopia óptica	141
5.3.1.4 Evolução das culturas de calo embriogénico	142
5.3.1.5 Produção de embriões globulares	146
5.3.2 Alteração das condições do protocolo base de inoculação	148
5.3.2.1 Efeito da inoculação das folhas à luz (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. luz)	148
5.3.2.2 Efeito da execução de mais cortes (folhas com 6 a 9 cortes e 8 sem. escuro)	149
5.3.2.3 Influência da incubação permanente do calo embriogénico no escuro	149
5.3.3 Histodiferenciação dos embriões globulares	150
5.3.4 Obtenção de embriões somáticos precocemente germinados (e.p.g.s)	154
5.3.4.1 Obtenção de e.p.g.s em calo embriogénico subcultivado em meio líquido	157
5.3.4.2 Conversão dos e.p.g.s	159
5.3.4.3 Aclimatização de plantas obtidas de e.p.g.s	161
5.3.4.4 Observação da morfologia dos e.p.g.s	162

5.3.5 Embriogénese repetitiva a partir de embriões precocemente germinados (e.p.g.s)	165
5.3.5.1 Tipos de embriogénese repetitiva obtida a partir de e.p.g.s	165
5.3.5.2 Embriogénese repetitiva via produção de calo embriogénico formado de <i>novo</i>	167
5.3.5.2.1 Germinação e conversão de embriões somáticos de calo embriogénico formado <i>de novo</i>	169
5.3.5.2.2 Determinação do nº de embriões em calo embriogénico formado <i>de novo</i>	169
5.3.6 Microscopia electrónica de varrimento	170
5.3.6.1 Observação de embriões globulares formados no meio de indução I6	170
5.3.6.2 Exemplos de embriogénese repetitiva em e.p.g.s de anormal morfologia	171
5.3.6.3 Observação de embriões somáticos em calo embriogénico formado <i>de novo</i>	172
5.4 Discussão	174
5.4.1 Indução de calo embriogénico	174
5.4.1.1 Influência da origem e do tratamento das folhas	174
5.4.1.2 Influência dos reguladores de crescimento	177
5.4.1.3 Evolução das culturas de calo embriogénico	177
5.4.2 Produção de embriões globulares	178
5.4.3 Histodiferenciação dos embriões globulares	180
5.4.4 Produção de embriões precocemente germinados	182
5.4.5 Conversão dos embriões precocemente germinados	184
5.4.6 Aclimatização das plantas obtidas dos e.p.g.s	184
5.4.7 Embriogénese repetitiva a partir de embriões precocemente germinados	185
5.5 Conclusão	187
Referências bibliográficas	188
Conclusões gerais	195
Anexo	201

Capítulo 1

Introdução geral

Uma parte deste capítulo foi anteriormente publicada:

Conde P, Sousa A, Santos C (2006) (artigo de revisão) A grafiose do ulmeiro: estratégias de controlo da doença e de conservação do ulmeiro. Biologia Vegetal e Agro-Industrial, APBVAI, (edições sílabo) Vol. 2: 55 - 67

1 Introdução geral

Sumário

O ulmeiro com predominância em Portugal, *Ulmus minor* Mill., é uma árvore de extrema importância pelas suas características como ornamental e como fornecedora de madeira de óptima qualidade. Os ulmeiros têm sido largamente utilizados em zonas rurais e urbanas devido às suas capacidades de tolerância a factores adversos como poluição urbana, frio, ventos fortes, mutilação das raízes e solos nutricionalmente pobres (Stipes e Campana 1981). Infelizmente, a grafiose do ulmeiro, ou Doença Holandesa do Ulmeiro (Dutch Elm Disease - DED), está a ameaçar seriamente esta espécie assim como outras espécies do género *Ulmus* distribuídas pelo Hemisfério Norte. A doença é provocada por um fungo e, desde o início do século passado, tem provocado a morte a milhares de ulmeiros. Esta catástrofe desencadeou, na Europa e na América do Norte, uma intensa investigação que teve como objectivos o combate à doença e a conservação e melhoramento do ulmeiro.

Este capítulo aborda o ulmeiro e a grafiose quanto à sua manifestação, caracterização, prevenção e controlo. Refere também alguns dos programas de conservação que têm sido desenvolvidos na Europa e na América do Norte para preservação deste género. No final do capítulo, faz-se referência a uma das áreas da biotecnologia do ulmeiro que foi grandemente impulsionada pelo problema da grafiose: a cultura *in vitro*. Nos últimos vinte e cinco anos, vários sistemas de cultura foram aperfeiçoados com o intuito de estudar a relação planta – agente patogénico e de obter sistemas de regeneração eficientes que pudessem ser usados na preservação e no melhoramento do ulmeiro. No entanto, a cultura *in vitro* do ulmeiro exhibe grande variabilidade e é frequente que, para um determinado genótipo, seja necessário desenvolver um particular sistema de cultura. Para além disso, dada a diminuição do número de ulmeiros e, conseqüentemente, da sua variedade é importante definir estratégias de preservação dos indivíduos que se encontram perfeitamente adaptados a determinado habitat. Por estas razões, o estabelecimento da cultura *in vitro* do ulmeiro Português era fundamental.

A cultura *in vitro* de *U. minor* foi iniciada usufruindo de algum trabalho anteriormente desenvolvido para o género. Foram assim aperfeiçoados vários protocolos

de obtenção de plantas usando diferentes modos de regeneração. Numa perspectiva de melhoramento da espécie, foram estabelecidos protocolos de isolamento e cultura de protoplastos que poderão ser usados em futuros projectos com este objectivo. Finalmente, o estudo da embriogénese somática em *U. minor* foi abordado com especial interesse e detalhe, dado esta ser uma das vias mais lucrativas e promissoras de regeneração de plantas que ainda não tinha sido experimentada para o género *Ulmus*.

1.1 O ulmeiro

O ulmeiro é uma árvore caducifólia pertencente ao género *Ulmus* que se integra na família Ulmaceae da ordem Urticales (Navarro e Castroviejo 1993). Esta árvore pode atingir entre 30 a 40 m de altura, possui ritidoma fendido, produz flores hermafroditas e o seu fruto é uma sâmara. As folhas inserem-se nos ramos de forma alternada, são assimétricas na base do limbo e têm margens serrado-dentadas (Fig.s 1.1A a 1.1C). Estas duas últimas características distinguem os ulmeiros de todos os outros membros da tribo a que pertencem e de quase todas as outras árvores (Richens 1983).

Os ulmeiros encontram-se essencialmente distribuídos pelas regiões temperadas do Hemisfério Norte. Embora o género seja geralmente bem definido a delimitação das espécies tem sido controversa devido a uma grande variabilidade da forma e do tamanho das folhas e à ocorrência frequente de hibridação entre espécies (Navarro e Castroviejo 1993; Jeffers 1999). Dificuldades adicionais na delimitação das espécies resultam da perturbação realizada pelo Homem na sua nomenclatura vulgar e na sua distribuição natural (Wiegrefe et al. 1994). Enquanto para Richens (1983) o género é constituído por 30 espécies, Wiegrefe et al. (1994) referem que existem, aproximadamente, 45 espécies lenhosas dentro da família Ulmaceae.

A associação entre o ulmeiro e a espécie humana surgiu há milhares de anos (Richens 1983). No passado, as folhas e ramadas tenras dos ulmeiros foram utilizadas para alimentação do gado e, em alturas de escassez de alimentos, as folhas jovens eram cozidas como hortaliça e a casca era utilizada como farinha para fazer pão. A madeira dos ulmeiros apresenta grande rigidez e resistência ao lascar e à putrefacção, quando mantida húmida.



Figura 1.1 O ulmeiro. (A) Ulmeiro localizado na Avenida Dr. Lourenço Peixinho em Aveiro. (B) Ramos de ulmeiro com flores. (C) Ramos de ulmeiro com sâmaras que são o fruto desta árvore.

Por estas razões, foi usada ao longo dos tempos na construção naval, no fabrico de arcos, flechas, carroças, arados e em condutas de água. No presente é muito apreciada para a escultura de peças de arte e no fabrico de mobiliário. Para além destas aplicações, os ulmeiros são actualmente utilizados como árvores ornamentais em vias de circulação, em

parques urbanos e como sebes em zonas rurais (Richens 1983). A sua tolerância à poluição das cidades e a boa adaptabilidade a solos pobres têm feito dos ulmeiros um elemento importante das paisagens urbana e rural na Europa, Ásia e América do Norte (Wiegrefe et al. 1993).

1.2 O ulmeiro e a grafiose

Embora tolerantes a factores ambientais desfavoráveis os ulmeiros são, no entanto, atacados por uma série de doenças causadas por vários agentes patogénicos (Stipes e Campana 1981). A grafiose é uma dessas doenças e é, de longe, a mais devastadora das doenças dos ulmeiros. A grafiose é provocada por um fungo e transmitida por um escolitídeo vector. Esta designa-se como grafiose do ulmeiro ou Doença Holandesa do Ulmeiro (Dutch Elm Disease - DED) por ter sido primeiramente detectada na Holanda. Durante o século passado, na Europa e América do Norte, as populações naturais de ulmeiros, bem como os indivíduos plantados, foram dizimados por esta doença que provocou a morte a milhões de árvores. A grafiose foi descrita pela primeira vez em 1919, numa altura em que atingia já a maior parte da Holanda e da Bélgica e parte do norte de França (Holmes 1990). Por volta dos anos 40, numa altura em que a primeira pandemia, embora ainda em curso, estava relativamente controlada, surgiu uma nova pandemia provocada por uma forma mais agressiva do fungo (Brasier 2000).

1.2.1 O agente patogénico e o vector da grafiose do ulmeiro

O fungo responsável pela grafiose pertence à família Ophiostomataceae. A sua classificação taxonómica sofreu várias alterações desde a sua descrição original até ao início dos anos 80 quando a designação *Ophiostoma ulmi* passou a ser a mais aceite (Holmes 1981). A nova pandemia da doença foi atribuída a uma estirpe particularmente agressiva de *O. ulmi* dentro da qual se distinguiram depois duas raças: a Norte-Americana (NAN) e a Euro-Asiática (EAN) (Brasier 1979). Posteriormente, esta estirpe passou a ser considerada como uma espécie separada, embora intimamente relacionada, de *O. ulmi*

sendo classificada como *O. novo-ulmi* Brasier e as raças, por seu turno, foram designadas como subespécies daquela (Brasier 1991). Frequentemente, quando se fala da grafiose utiliza-se ainda a designação *O. ulmi* ou *O. ulmi (sensu lato)* para designar qualquer das espécies (Dewar e Bernier 1993; Bernier e Hubbes 1994). Mais tarde, Brasier e Mehrotra (1995) descreveram uma terceira espécie, *O. himal-ulmi*. Esta espécie foi encontrada nos Himalaias, num ulmeiro dito resistente (*Ulmus wallichiana* Planch.), e gerou a hipótese de a grafiose ter tido a sua origem nesta região (Brasier e Mehrotra 1995).

O isolamento do fungo que provoca a grafiose pode ser realizado em laboratório usando o método de Brasier (1981). Este método consiste na cultura de pedaços de ramos jovens de um ulmeiro infectado (Fig. 1.3B), em extracto de malte agarizado (Fig. 1.2A), depois de estes terem sido superficialmente lavados e flamejados com álcool. Através deste procedimento obtém-se um micélio branco com a morfologia típica da espécie (Brasier 1981) (Fig. 1.2B).



Figura 1.2 O fungo da grafiose. (A) Micélio de *Ophiostoma ulmi (sensu lato)* obtido a partir da cultura de ramos infectados, em placa com extracto de malte agarizado. (B) Micélio completo que mostra os anéis de crescimento diurno do fungo. (C) Sinema sobre um pedaço autoclavado de madeira de ulmeiro.

O fungo produz dois tipos de esporos assexuados, ou conídios, que são os principais responsáveis pela progressão e disseminação da doença. Quando o sistema vascular de um ulmeiro saudável é atingido, pequenos grupos de conídios ovais são formados no micélio que se vai espalhando pelo xilema. Estes conídios são disseminados pelo xilema, germinam produzindo novo micélio e espalham a doença pela árvore. Em árvores mortas, ou a morrer, existe um segundo tipo de conídio que é produzido no micélio que cresce nos túneis escavados pelo vector. Estes conídios são produzidos em estruturas que são designadas como sinema (Fig. 1.2C). Cada uma destas estruturas é formada por grupos de hifas que se fundem para formar um pedúnculo escuro que termina numa cabeça incolor que possui os conídios pegajosos (D' Arcy 2000). Em laboratório, estas estruturas

podem ser obtidas em lascas autoclavadas de madeira de ulmeiro (Hiratsuka e Takai 1978) (Fig. 1.2C). Para além dos esporos assexuados, quando existe conjugação sexuada, são também produzidos esporos sexuados, ascósporos, em corpos de frutificação denominados peritécio, que são formados isolados, ou em grupo, na casca do ulmeiro (D' Arcy 2000).

Na Europa, os vectores do fungo são escolitídeos da casca da família Scolytidae, principalmente *Scolytus scolytus* Fabr. e *S. multistriatus* Marsh. Estes insectos alimentam-se em ramos jovens de ulmeiros saudáveis e utilizam ulmeiros debilitados para a sua reprodução, escavando túneis debaixo da casca onde depositam os ovos (Webber 2000).

A propagação da doença está intimamente ligada ao ciclo biológico do escolitídeo vector. Para se reproduzir a fêmea é atraída para árvores mortas ou a morrer, ou até para madeira cortada de ulmeiro. As fêmeas adultas perfuram a casca e escavam túneis entre esta e o lenho onde depositam os seus ovos. Os ovos eclodem e as larvas escavam novos túneis, perpendiculares aos iniciais, enquanto se alimentam do lenho e do interior da casca, formando o que se designa como uma galeria (Fig. 1.3J). Entretanto, se o ulmeiro está infectado, nas galerias escavadas pelo vector são também produzidos os conídios pegajosos do fungo. Ao emergirem, quando adultos, os escolitídeos voam para a copa de ulmeiros saudáveis e transportam assim dentro e/ou agarrados ao seu corpo os esporos pegajosos. À medida que os escolitídeos se alimentam em ramos jovens, os esporos do fungo são depositados nas feridas de alimentação. Os esporos germinam e produzem micélio que cresce até atingir o xilema onde milhões de pequenos conídios são espalhados, iniciando um novo ciclo de infecção (Lanier e Peacock 1981).

1.2.2 Manifestação e caracterização da grafiose do ulmeiro

O primeiro sintoma externo de infecção é a murchidão das folhas (Fig. 1.3A) em ramos isolados que, rapidamente, se estende a toda a árvore. As folhas ficam, frequentemente, amarelas e depois castanhas, a seguir enrolam e finalmente caem provocando a morte rápida dos ramos. A murchidão é atribuída a um fornecimento inadequado de água devido à oclusão vascular. Esta oclusão é provocada pela presença de conídios e de micélio do fungo mas, também, devido à produção de tilos e gomas por parte

do hospedeiro, numa tentativa de bloquear a progressão do fungo (Elgersma 1981). Para além disso, segundo Elgersma (1981) o fungo produz enzimas que degradam a parede dos vasos levando, consequentemente, à libertação de restos da parede celular que também impedem o transporte de água. O segundo sintoma externo da grafiose é o desenvolvimento de manchas castanhas na madeira. Os ramos recentemente infectados apresentam, caracteristicamente, listas castanhas, contínuas ou descontínuas, na parte externa da madeira. A detecção deste sintoma pode ser facilmente realizada procedendo ao corte de um ramo doente e à remoção da casca. Se o ramo infectado pertencer a um ulmeiro que ficou doente no ano anterior, em corte transversal o ramo apresenta um anel formado por manchas castanhas que foi coberto pela madeira produzida no novo ano (Fig. 1.3B) (Haugen 1998).

Quando a doença atinge apenas uma parte da árvore, esta pode morrer no prazo de meses a dois ou mais anos. Quando a doença atinge toda a árvore esta morre em poucas semanas. Devido ao facto de os insectos vectores terem duas gerações anuais, uma em Maio-Junho e outra em Agosto-Setembro, a difusão da grafiose dá-se num período que vai desde o início da primavera ao final do verão. As árvores infectadas no início da primavera morrem, frequentemente, com maior rapidez, enquanto as infectadas no final do verão demoram mais tempo a morrer e podem até produzir rebentos na primavera seguinte (D'Arcy 2000).

Para além da via de infecção, acima descrita, os ulmeiros podem ainda ser infectados devido aos enxertos de raiz que são formados entre uma árvore saudável e uma infectada. Esta via de propagação da doença ocorre em árvores plantadas muito próximas umas das outras, como no caso dos ulmeiros ornamentais distribuídos ao longo de ruas nas cidades (Fig. 1.3C) (Holmes 1981).

1.2.3 Estratégias de prevenção e tratamento da grafiose do ulmeiro

Existem duas formas de lidar com a grafiose, a prevenção e a cura. A primeira engloba todas as acções de redução ou eliminação do agente patogénico e do insecto vector, de forma a evitar a sua disseminação. A forma mais fácil de evitar a disseminação do fungo e do seu vector é pela eliminação do material infectado. Para isso toda a madeira

infectada deve ser cortada e incinerada e não deve ser armazenada. Como medidas curativas os ramos infectados devem ser podados, logo após os primeiros sinais de murchidão, e todo o indivíduo deverá ser tratado com um fungicida (Stipes 2000). Desde os anos 30, vários fungicidas foram testados na prevenção e cura da grafiose, a maior parte deles sem sucesso. Posteriormente, estudos mais exaustivos mostraram que, entre vários compostos testados, os fungicidas Arbotect 20S® e Alamo® mostravam uma boa eficácia, quando devidamente aplicados (Stennes 2000). Apesar dos bons resultados da injeção de fungicidas, por várias razões, este tratamento só é realizado em indivíduos com interesse histórico ou botânico. Estas razões são: o dispendioso custo deste tipo de injeção; a necessidade de a aplicação só poder e dever ser efectuada por pessoal treinado; a necessidade de a aplicação ser repetida de três em três anos, quando usada como medida preventiva; a inexistência de garantias de que a aplicação de fungicida vai salvar a árvore, quando usada como medida terapêutica (Stennes 2000).

Para além das medidas acima referidas, muitas outras foram já testadas. Uma destas medidas teve como objectivo a eliminação do insecto vector por pulverização de um insecticida na copa das árvores. Devido à possibilidade de contaminação do meio ambiente, de potenciais riscos para a saúde pública e ao seu dispendioso custo, esta medida não é muito recomendada (Stipes 2000). Como alternativa ao controlo químico, que advém do uso de fungicidas e insecticidas, foi também testado o controlo biológico. Ao nível do controlo do escolítídeo vector foram usadas armadilhas com feromonas (Lanier 1989). Ao nível do controlo biológico do agente patogénico várias situações foram testadas. Bernier et al. (1996) testaram o uso do fungo *Phaeoteka dimorphospora* como antagonista de *O. ulmi* e *O. novo-ulmi*. Por outro lado, Shi e Brasier (1986) realizaram experiências de controlo da grafiose injectando os ulmeiros com espécies da bactéria *Pseudomonas*. Os resultados da utilização destes, e de outros organismos, na inibição do crescimento do fungo foram promissores mas, o progresso nesta área foi dificultado pela frequente ausência de correlação entre os estudos *in vitro* e *ex vitro* e falta de coerência nos resultados obtidos em diferentes espécies de ulmeiro (Elgersma et al. 1993; Bernier et al. 1996).

Enquadrados nas medidas de saneamento e prevenção da doença, nos Estados Unidos da América e Canadá foram desencadeados programas e constituídas associações

locais que ensinam a população a lidar com um ulmeiro infectado, indicando os procedimentos a seguir (Kansas State University 2004; SDEDA 2005). No Canadá existe um regulamento sobre a grafiose, com indicações do que é necessário fazer em caso de árvores ou madeira infectadas e das coimas a aplicar a quem não cumprir o que está estipulado (CanLII 2005).

1.2.4 Estratégias de melhoramento e de conservação do ulmeiro

Em simultâneo com as abordagens terapêuticas e de saneamento da doença foram também iniciados programas de melhoramento, utilizando técnicas tradicionais de cruzamento e selecção com o objectivo de obter indivíduos tolerantes à doença. Nos Estados Unidos da América, onde a espécie dominante é o ulmeiro Americano (*Ulmus americana* L.), o Departamento de Agricultura (USDA) iniciou um programa deste tipo em 1937, no qual milhares de ulmeiros foram testados quanto à tolerância que exibiam em relação à grafiose e ao insecto vector. Destes testes, e de cruzamentos entre várias espécies, foram obtidas 11 cultivares que possuíam diferentes graus de tolerância à doença (Townsend 2000). Desde o início das experiências de cruzamento que os investigadores verificaram que as espécies Asiáticas exibiam grande tolerância à grafiose e ao insecto vector (Smalley e Guries 2000). Com a maior abertura da China, um grande número de espécies Asiáticas de ulmeiro foram adquiridas e testadas na esperança de conseguir importar destas os genes de tolerância (Smalley e Guries 2000). Neste âmbito, vários hortos iniciaram cruzamentos com aquele objectivo, entre os quais o “Morton Arboretum”, dos quais resultaram várias cultivares que exibem tolerância à grafiose, e outras doenças dos ulmeiros, fazendo com que os ulmeiros voltassem a fazer parte das listas municipais de árvores para cultivo (Ware 2000; Warren 2000).

Na Europa, os programas de melhoramento do ulmeiro foram desencadeados ainda mais cedo que nos Estados Unidos da América. O primeiro projecto deste tipo foi iniciado na Holanda em 1928 e continuado por Heybroek desde 1953 até 1992, altura em que o financiamento cessou e, por essa razão, muito material foi perdido e outro não foi testado (Heybroek 2000). Durante os 64 anos desse programa mais de 200.000 plântulas e 2000

clones foram testados quanto à tolerância à grafiose, e outras propriedades, tendo sido obtidos 9 clones com boas características que foram comercializados na Europa (Heybroek 1993). Noutros países Europeus, como a Itália e a Espanha, foram também desenvolvidos programas deste tipo, embora mais tardiamente que na Holanda. Em Espanha, devido à elevada mortalidade de *U. minor*, verificada em todo o país, foi iniciado em 1986, pela Universidade Politécnica de Madrid, um programa de conservação do ulmeiro contra a grafiose. Os objectivos do programa eram preservar a maior variedade possível de ulmeiros nativos e obter indivíduos tolerantes após cruzamento com *Ulmus pumila* L., uma espécie descrita como tolerante, que está bem adaptada em Espanha (Solla et al. 2000).

Apesar dos esforços desenvolvidos nos vários países, os diferentes programas nacionais não possuíam qualquer coordenação a nível internacional e não havia um protocolo comum em relação à caracterização, avaliação e gestão a longo termo das colecções resultantes (Collin et al. 2000). Felizmente, foi criado em 1997 um projecto designado GENRES 78 em colaboração com o programa Europeu EUFORGEN (“EUropean FOrest GENetic Ressources Programme”) para lenhosas nobres, que permitiu uniformizar estes esforços (Cemagref 1999). Em Março de 1996, no primeiro encontro do programa EUFORGEN, as três espécies Europeias do género *Ulmus* (*Ulmus minor* Mill., *Ulmus glabra* Huds., e *Ulmus laevis* Pall.) foram identificadas, pelos países participantes, como espécies prioritárias no desenvolvimento de estratégias de conservação a longo termo na Europa. O projecto GENRES 78 tinha como título geral: “Coordenação para a conservação, caracterização, colecção e utilização dos recursos genéticos dos ulmeiros Europeus”. O projecto de cinco anos foi suportado pela União Europeia, coordenado pelo Cemagref (França) e envolveu 17 institutos e 9 países Europeus (França, Itália, Reino Unido, Espanha, Alemanha, Portugal, Bélgica, Suécia, Grécia) (Cemagref 1999). Sumariamente, os objectivos a atingir eram: elaboração de uma base de dados com todos os clones dos diferentes parceiros; caracterização da diversidade genética com marcadores moleculares; triagem de clones valiosos das colecções existentes quanto à sensibilidade à grafiose (tolerância ao agente patogénico e/ou ao insecto vector) e quanto às características ornamentais; assegurar a conservação, a longo termo, mantendo os clones em sebes baixas, não atractivas para o insecto vector, e implementar a conservação por criopreservação. Os progressos dos dois primeiros anos podem ser visualizados no endereço electrónico do programa (Cemagref 1999). Como resultado desta coordenação existe em Valsain

(Espanha) um banco clonal com quatro cópias de 120 genótipos provenientes de França, Itália, Grécia e Portugal, para além de cópias de genótipos do próprio país (Solla et al. 2000). Em relação à criopreservação, os resultados foram recentemente publicados por Harvengt et al. (2004) que apresentaram com sucesso a criopreservação de clones do género *Ulmus* colhidos nos 9 países que englobaram o projecto. Em Portugal, os coordenadores deste projecto foram o Dr. Alexandre Aguiar e a Dr.^a Maria Carolina Varela da Estação Florestal Nacional. Actualmente, o interesse no ulmeiro como género a conservar ainda permanece. A rede de trabalho em árvores de folha larga de localização dispersa (“Scattered Broadleaves Network”), que foi implementada no início do ano 2005, vai, de certa forma, continuar e complementar o trabalho anterior (EUFORGEN 2005^a). A representante desta rede de trabalho em Portugal é a Dr.^a Maria Carolina Varela da Estação Florestal Nacional (EUFORGEN 2005^b).

1.3 Ocorrência da grafiose do ulmeiro em Portugal

1.3.1 Descrição e caracterização do ulmeiro que predomina em Portugal

Em Portugal são habitualmente cultivadas duas espécies de ulmeiro, *Ulmus glabra* Huds. e *Ulmus minor* Mill., com predominância desta última (Jorge Paiva, comunicação pessoal, 1998). Em Portugal o ulmeiro também é vulgarmente conhecido como olmo, negrilho ou álamo. A plantação de ulmeiros ocorre em zonas rurais onde funcionam como “corta-ventos” ou como separadores de terrenos e, em parques urbanos ou ao longo de estradas como ornamentais. Também existem, principalmente no norte do país, populações naturais de *U. minor* (Richens 1983). Esta espécie é particularmente variável no que respeita ao hábito e morfologia foliar (mesmo considerando que essa é já uma característica típica do género), razão pela qual se distinguem frequentemente dentro dela diferentes variedades (Richens 1983; Navarro e Castroviejo 1993).

No norte da Europa, esta espécie raramente produz sementes viáveis por ser particularmente sensível às condições ambientais pós-fecundação, nomeadamente em relação à humidade e à temperatura, que têm de se manter dentro de limites estreitos (Richens 1983). Em Portugal, a germinação de sementes é frequentemente verificada mas,

U. minor tem também a capacidade adicional de se reproduzir por rebentos de raiz. Esta característica proporciona, no entanto, o desenvolvimento de populações com reduzida variabilidade genética (Collin et al. 2000). Para além disso, a intervenção humana tem contribuído ainda mais para a existência deste tipo de populações, devido ao cultivo intensivo do ulmeiro. Por tudo isto, o objectivo a atingir com *U. minor* no projecto GENRES 78 era caracterizar e avaliar as colecções existentes e, por outro lado, complementar essas colecções com amostras de localizações sem intervenção humana, de forma a obter material com uma maior diversidade genética (Collin et al. 2000).

Assim como em toda a Europa e América do Norte, em Portugal as populações naturais de ulmeiros, bem como os indivíduos cultivados, também têm sido seriamente afectados pela grafiose. Aparentemente, não existem em Portugal registos precisos sobre a altura em que surgiu a doença e de que forma progrediu. Apenas temos conhecimento de um documento da Estação Florestal Nacional, publicado em 1979, no qual se reconhece a ocorrência da doença em todo o país. Este documento refere resumidamente a sintomatologia da doença e o ciclo biológico do fungo sem, no entanto, fazer uma análise detalhada da situação em Portugal.

1.3.2 Descrição da evolução da grafiose em algumas zonas de Portugal

Ao longo da última década, foram observados vários locais de manifestação da grafiose em Portugal. Na primavera de 1995 constatou-se que, no Nordeste Transmontano, a maior parte dos ulmeiros adultos já tinham sido dizimados (Fig 1.3D) e substituídos por grupos de pequenos ulmeiros que surgiam da raiz que restava dos exemplares mortos. Em termos ecológicos, foi particularmente dramática, nesta região, a destruição da extensa população de ulmeiros do Parque Natural de Montesinho. Uma vez que, no Nordeste Transmontano, já quase não existiam ulmeiros adultos, houve necessidade de encontrar um outro local para recolha de material. O local eleito foi a Mata Nacional do Choupal, em Coimbra, onde foi autorizada a colheita e marcação das árvores que apresentassem características de interesse científico. No final do ano de 1995 foram marcadas 19 árvores e, no ano seguinte, foi seleccionado um outro lote de 14 árvores, porque a grafiose já se estava a manifestar na mata, 31,6% (6/19) das árvores marcadas tinham sido atingidas pela



Figura 1.3 Manifestação da grafiose em Portugal. (A) Ramos infectados que exibem sinais da doença, murchidão e acastanhamento das folhas. (B) Ramos infectados, vistos em corte transversal, que exibem coloração castanha da zona xilémica. (C) Antiga vista da Rua de Tomar em Coimbra, com um túnel formado por ulmeiros que pereceram. (D) Resto de um ulmeiro adulto em Mirandela, onde praticamente já só existem indivíduos jovens provenientes da rebentação dos cepos de ulmeiros adultos (pequenas árvores situadas mais ao fundo da fotografia). (E) Ulmeiro infectado situado no Choupal em Coimbra. (F) Ulmeiro doente no jardim do antigo Departamento de Biologia da U. de Aveiro. (G) Ulmeiro doente situado junto à fábrica da Vista Alegre, em Ílhavo. (H) Ulmeiros doentes da Praça Maia Magalhães em Aveiro. (I) Abate dos ulmeiros anteriores. (J) Tronco de um dos ulmeiros abatidos que mostra as galerias do escaravelho vector.

doença (Fig. 1.3A e 1.3E) provocando a morte a cerca de um terço do grupo. Uma percentagem de mortalidade próxima daquela foi também encontrada num levantamento efectuado pelos elementos do serviço da Mata, naqueles dois anos consecutivos. Nos anos 1995 e 1996 foram contabilizados os ulmeiros saudáveis, com diâmetro à altura do peito acima de 10 cm, que se encontravam em 5 dos talhões da Mata. Entre as duas contagens constatou-se que 140 dos 390 (35,9%) ulmeiros existentes no ano de 1995 tinham morrido. No verão de 2002, sete anos depois da nossa primeira contagem, apenas 2 das 33 árvores por nós marcadas foram encontradas saudáveis, o que indica que, neste grupo, foi atingida uma percentagem de mortalidade de 93,9%. Ao longo daqueles sete anos de manifestação da grafiose na Mata, os “buracos” provocados pelo abate dos ulmeiros foram bem visíveis e contribuíram, notoriamente, para a acentuada diminuição do número de árvores do Choupal.

Derivado desta recolha existe na Universidade de Aveiro uma colecção de ulmeiros da Mata Nacional do Choupal, que tem sido mantida ao longo dos últimos dez anos. Com estes génotipos, foram desenvolvidas estratégias de conservação do ulmeiro com recurso a técnicas de micropropagação por segmentos nodais e embriogénese somática (Sousa et al. 1996; Sousa et al. 1998; Conde et al. 2004).

A grafiose atingiu ainda neste período diversas cidades onde o ulmeiro era um elemento importante da paisagem urbana como é o caso de Coimbra e Aveiro. Em Coimbra este flagelo foi particularmente impressionante na rua de Tomar, uma rua que possuía um “túnel” formado por ulmeiros (Fig. 1.3C), que em 1996 começaram a mostrar sintomas da doença e acabaram por morrer. Provavelmente, a rápida evolução da doença foi, neste caso, devida à existência de enxertos entre as raízes dos inúmeros indivíduos que se encontravam ao longo da rua. Em Aveiro, os ulmeiros majestosos que existiam na praça Maia Magalhães foram atingidos pela doença no verão de 1998 (Fig. 1.3H) e foram abatidos em Julho de 2000 (Figs 1.3I e 1.3J) pelos serviços da Câmara Municipal. Distribuídos pela cidade, numerosos ulmeiros foram também afectados pela doença, nomeadamente os que se encontravam nos jardins que rodeiam o *Campus* Universitário, onde em alguns casos, se observou uma evolução extraordinariamente rápida da doença (Fig. 1.3F). Observou-se ainda que a grafiose foi também responsável pela morte de numerosos ulmeiros localizados nos terrenos da fábrica da Vista Alegre em Ílhavo. Alguns destes ulmeiros tinham sido classificados, pela Direcção Regional de Agricultura da Beira

Litoral, como exemplares de flora de interesse nacional tendo sido posteriormente desclassificados e abatidos por estes serviços (Fig. 1.3G). Mais a sul do país, testemunhámos também os seus efeitos na região do vale do rio Tejo.

Em todas as zonas acima referidas, a grafiose continua a provocar danos e a eliminar da paisagem Portuguesa uma das mais belas espécies arbóreas.

1.4 Biotecnologia do ulmeiro aliada às tentativas de controlo da grafiose

Apesar de todo o trabalho realizado ao longo de quase 100 anos de pesquisa, os progressos no controlo da grafiose têm sido muito limitados (Dunn 2000). Guries e Smalley (2000) referiram na última Conferência Internacional do Ulmeiro (Morton Arboretum, Lisle, América do Norte) que as pesquisas a longo prazo no melhoramento do ulmeiro terão de estar inseridas numa de três etapas inter-relacionadas e que os investigadores terão de trabalhar de uma forma mais concertada.

A primeira etapa desta pesquisa refere-se à selecção de indivíduos com características de interesse que já foi realizada, tanto na América do Norte como na Europa, nos programas tradicionais de cruzamento e selecção. A segunda etapa refere-se à aplicação dos avanços da pesquisa genómica de acordo com o já efectuado com outras lenhosas. No caso do ulmeiro o mapeamento de genes de resistência à grafiose das espécies que se mostram resistentes seria extremamente importante. A terceira etapa refere-se à transferência dos genes de resistência para ulmeiros que mostram possuir boas características ornamentais, boa adaptabilidade a um determinado habitat ou tolerância a outras doenças que não a grafiose (Guries e Smalley 2000).

Apesar de decorridos vinte e cinco anos de aplicação de várias abordagens biotecnológicas com o objectivo de melhorar o ulmeiro (Sticklen e Sherald 1993; Dunn 2000), nenhuma destas foi realmente bem sucedida e os indivíduos que existem para plantação continuam a ser os que surgiram dos programas clássicos de cruzamento. Por estas razões, a biotecnologia do ulmeiro mantém-se potencialmente valiosa, principalmente, se aliada àqueles programas (Guries e Smalley 2000).

1.4.1 Cultura *in vitro* do ulmeiro

Ao nível da biotecnologia do ulmeiro vários estudos em diferentes áreas foram realizados nos últimos vinte e cinco anos. Uma das áreas em que houve um elevado investimento foi na cultura *in vitro* do ulmeiro. A introdução *in vitro* do ulmeiro sofreu um grande impulso no início dos anos oitenta devido às contrariedades verificadas com os programas tradicionais de cruzamento e selecção: 1) estes ensaios eram muito demorados, uma vez que só podiam ser realizados em árvores com pelo menos três anos de idade que teriam de ser sujeitas a inoculações em anos sucessivos (Heybroek 1993); 2) muitas vezes, os híbridos obtidos não possuíam a qualidade estética à qual as pessoas estavam habituadas; 3) em relação ao ulmeiro Americano, havia ainda a impossibilidade de efectuar cruzamentos com as outras espécies devido à sua incompatibilidade sexual (Karnosky e Podila 1993).

Numa tentativa de transpor a morosidade dos programas tradicionais de melhoramento, começaram a ser efectuados estudos em que culturas de calo de ulmeiro foram sujeitas a filtrados de cultura do fungo. Estes estudos tinham vários objectivos, para além da selecção de linhas de calo que se mostrassem tolerantes ao fungo, entre os quais a determinação das melhores condições de crescimento tanto do fungo como do calo e a comparação das respostas de espécies susceptíveis e tolerantes e de isolados agressivos e não agressivos do fungo (Pijut et al. 1990; Domir et al. 1991; Domir et al. 1992; Schreiber e Domir. 1994).

Usando este método de sujeição ao fungo, um grupo de substâncias denominadas “mansonones” foi isolado e relacionado com a resposta do hospedeiro à presença do fungo (Yang et al. 1989; Yang et al. 1994). Estes resultados levaram à descoberta de uma glicoproteína, presente no filtrado de cultura do fungo, que induzia a produção destas “mansonones” (Yang et al. 1989; Hubbes 1993). Estudos sobre este assunto têm sido desenvolvidos pela equipa do investigador Martin Hubbes na Universidade de Toronto, desde finais dos anos oitenta (Hubbes 2000). Actualmente, esta equipa possui um tratamento preventivo para a grafiose baseado no isolamento daquela glicoproteína, que funciona como um elicitor (Yang et al. 1994; Hubbes 2000). Quando introduzido no sistema vascular da árvore este elicitor activa previamente os seus mecanismos de defesa fazendo com que, em caso de infecção, o ulmeiro possa limitar rapidamente a progressão

do fungo. Este elicitor foi designado ELMguard e encontra-se disponível para uso comercial, junto com indicações do modo de aplicação, embora os investigadores não assegurem que este actue em todos os ulmeiros devido à variabilidade genética destes (elmcare.com 2005).

Com o objectivo de ultrapassar a incompatibilidade sexual verificada entre o ulmeiro Americano e as outras espécies de *Ulmus*, surgiram os primeiros estudos de isolamento e cultura de protoplastos (Domir et al. 1993). O objectivo final destes estudos era obter produtos de fusão entre aquele ulmeiro e as espécies que mostravam tolerância à grafiose. Redenbaugh et al. (1980) foram os primeiros a isolar alguns protoplastos de células mãe de esporos, tétradas e micrósporos de *U. americana*. Apesar dos esforços, a regeneração de parede celular e a divisão celular não foram observadas. Seguidamente, os mesmos autores (Redenbaugh et al. 1981) isolaram protoplastos de cotilédones e calo de *U. americana*, *U. pumila*. e *Ulmus parvifolia* Jacq. Nesse trabalho foram também realizadas experiências de fusão com PEG mas apenas foram obtidos quatro produtos de fusão entre protoplastos de *U. pumila*. Uns anos mais tarde, Sticklen et al. (1985) e Sticklen et al. (1986) experimentaram o isolamento e cultura de protoplastos de calo dos híbridos ‘Homestead’ e ‘Pioneer’. Esta equipa ensaiou posteriormente a fusão de protoplastos mas não conseguiu obter nenhum híbrido somático (Domir et al. 1993). Entretanto, um grupo em França tinha iniciado também a sua pesquisa neste campo usando como fonte de protoplastos folhas de ulmeiros mantidos em estufa e folhas de plantas micropropagadas de várias espécies de *Ulmus* e de dois híbridos Holandeses (Dorion et al. 1983; Dorion et al. 1994). Apesar de terem obtido um pequeno número de plantas, estes autores nunca experimentaram a fusão.

Finalmente, verificou-se também um elevado investimento na micropropagação do ulmeiro. O interesse neste modo de propagação surgiu, principalmente, devido à necessidade de implementar um sistema de produção de plantas eficaz e reprodutível para posterior utilização em programas de melhoramento genético (Karnosky e Podila 1993).

O primeiro trabalho de regeneração *in vitro* do ulmeiro remonta a 1975 (Durzan e Lopushanski 1975). Já naquela altura a preocupação dos autores era a propagação de espécies resistentes como uma forma de ultrapassar o problema da grafiose. Posteriormente, surgiu um grande impulso nos estudos de micropropagação. A partir de vários explantes iniciais foram obtidos rebentos de várias espécies de *Ulmus*, incluindo

Ulmus campestris L., os híbridos Holandeses ‘Dodoens’, ‘Vegeta’ e ‘Commelin’ (Dorion et al. 1987) e o híbrido ‘Pioneer’ (Fink et al. 1986). No seguimento destes trabalhos, o primeiro grupo testou a influência da criopreservação dos rebentos *in vitro* quanto à sua capacidade de proliferação e enraizamento após a sua retirada do frio (Dorion et al. 1993) e estudou também a susceptibilidade dos rebentos a filtrados de cultura do fungo da grafiose (Dorion et al. 1994). Quase em paralelo, surgiu a publicação de um trabalho de micropropagação com o ulmeiro Inglês (*Ulmus procera* Salisb.), que visava já a transformação genética do ulmeiro (Fenning et al. 1993).

Por esta altura, a atenção dos investigadores começava a centrar-se no melhoramento genético porque este estava a mostrar potencialidades de transferência de resistência ao agente patogénico (Karnosky e Podila 1993; Sticklen et al. 1994). Posteriormente, vários trabalhos de regeneração de rebentos foram realizados como etapa base de concretização daquele objectivo (Bolyard et al. 1991^a; Dorion et al. 1995; Ben Jouira et al. 1998). Apesar dos esforços de vários grupos no sentido do desenvolvimento de eficientes sistemas de regeneração de plantas para posterior aplicação das técnicas de transformação, o primeiro grupo a referir a obtenção de ulmeiros geneticamente modificados foi o de Kevan Gartland da Universidade de Dundee, na Escócia. Este grupo iniciou os seus estudos em 1992 com o ulmeiro Inglês (*U. procera*) (Fenning et al. 1993) e referiu em 2001 (GM trees fight DED, 2001) a obtenção de ulmeiros transformados com genes de resistência a fungos. Quatro anos mais tarde, estes ulmeiros estavam já a ser testados quanto à sua resistência ao fungo que provoca a grafiose (Gartland et al. 2005).

Ainda no âmbito da regeneração de plantas, foram efectuados vários estudos, com diferentes espécies, usando folhas como explante inicial na presença de TDZ e/ou BA (Bolyard et al. 1991^b; George e Tripepi 1994; Kapaun e Cheng 1997; Ben Jouira et al. 2000). O principal objectivo destes últimos estudos foi, mais uma vez, o de estabelecer eficientes sistemas de regeneração de espécies e genótipos relevantes de *Ulmus*, a partir daquele tipo de explante.

1.4.2 Razões para a cultura *in vitro* do ulmeiro Português e plano geral da tese

Apesar de haver já um grande investimento em torno da biotecnologia do ulmeiro, Guries e Smalley (2000) afirmaram, na última Conferência Internacional do Ulmeiro (Morton Arboretum, Lisle, América do Norte), que muito há ainda a desenvolver neste campo ao nível da melhoria do género *Ulmus*. A cultura *in vitro* é uma área que permite a concretização deste propósito mas também os da preservação e multiplicação. No caso da população Portuguesa de ulmeiros estes dois últimos objectivos são prioritários uma vez que devido à sua diminuição em número há também uma perda acentuada da sua variedade genética. Protocolos de introdução *in vitro* foram já desenvolvidos para algumas espécies de *Ulmus* mas, segundo Karnosky e Podila (1993), os ulmeiros exibem uma acentuada variabilidade no que respeita ao seu cultivo *in vitro* pelo que, por vezes, é necessário um grande esforço para desenvolver um sistema fiável e reprodutível para determinados genótipos recalcitrantes. Foram estas as razões que ditaram a necessidade de realização de um estudo sobre a cultura *in vitro* de *U. minor*.

Para além das razões acima apontadas como necessárias à realização deste estudo, a cultura *in vitro* do ulmeiro que predomina em Portugal permite ainda: 1) a possibilidade de rejuvenescer e preservar material proveniente de árvores seculares que possuem características ornamentais, ou outras, de elevado interesse; 2) a possibilidade de multiplicar exemplares tolerantes, em larga escala, de forma a acelerar o processo de disponibilização de indivíduos para novas plantações; 3) a possibilidade de montar sistemas de regeneração de plantas a partir de diferentes tecidos, para posterior utilização em programas de melhoramento, como por exemplo, através da fusão de protoplastos; 4) a possibilidade de reintroduzir indivíduos de uma população perfeitamente adaptada a determinado habitat.

A adicionar às razões acima apontadas, Harvengt et al. (2004) afirmaram, recentemente, que a existência de um eficiente sistema de propagação *in vitro* é imprescindível na recuperação de clones de ulmeiros, após a sua conservação pelo frio, sendo esta a melhor forma de manutenção de colecções de ulmeiros. A manutenção de bancos clonais no campo está normalmente sujeita a factores adversos como doenças, pragas e intempéries e é muito dispendiosa envolvendo a actividade constante de técnicos. Naquele trabalho, os autores provaram que a criopreservação de botões de ulmeiros, aliada

à posterior recuperação *in vitro*, é economicamente mais competitiva que a manutenção de clones no terreno (Harvengt et al. 2004).

A cultura *in vitro* de *U. minor* foi iniciada com o desenvolvimento de protocolos eficientes de proliferação de rebentos a partir de árvores de campo. Os rebentos foram enraizados *in vitro* e/ou aclimatizados directamente em solo. As culturas de rebentos em proliferação serviram de fonte de material para quase todas as experimentações posteriores.

Ainda numa fase inicial dos ensaios, foram estabelecidas culturas de calo a partir de folhas de campo. As culturas de calo assim produzidas foram utilizadas na produção de rebentos adventícios e também no isolamento de protoplastos. A produção de rebentos adventícios foi também experimentada usando folhas de rebentos micropropagados.

Numa terceira etapa do trabalho, foram desenvolvidos protocolos eficientes de isolamento de protoplastos usando culturas de calo e folhas de plantas micropropagadas e de estufa. Estes foram isolados empregando várias combinações e concentrações de enzimas digestivas. Os protoplastos de folhas de rebentos *in vitro* foram cultivados segundo vários métodos de cultura tendo o método de cultura em gotas de agarose sido experimentado, pela primeira vez, para o ulmeiro.

A última fase do trabalho, que foi de longe a mais extensa, incidiu sobre o estabelecimento de culturas embriogénicas a partir de folhas dos rebentos estabelecidos *in vitro*. Este elevado investimento no estudo da embriogénese somática deveu-se ao facto de esta ser uma via de micropropagação vantajosa que ainda não tinha sido estabelecida para o género *Ulmus*. Giri et al. (2004) referiram, recentemente, numa revisão sobre os progressos da cultura *in vitro* de lenhosas, que a embriogénese somática é importante na biotecnologia de florestas por duas razões. A primeira deve-se ao facto de este sistema possuir a capacidade de produção de um número ilimitado de embriões somáticos e de sementes artificiais. A segunda deve-se ao facto de as culturas embriogénicas serem um material apropriado para estudos de transferência genética. Para além de tudo isto, este sistema de cultura possui ainda potencial para a utilização de bioreactores que permitem a produção em larga escala a nível industrial (Merckle e Dean 2000; Paek et al. 2005). Resumindo, pode-se afirmar que a obtenção de embriões somáticos de ulmeiro a partir de material adulto enquadra-se na estratégia actual adoptada do ulmeiro como uma indiscutível vantagem. A implementação de um eficiente sistema de produção de embriões

permite, por um lado, a propagação em larga escala e, por outro, possibilita a introdução deste tipo de cultura em programas de melhoramento do ulmeiro.

Referências bibliográficas

- Ben Jouira H, Bigot C, Dorion N (2000)** Plant regeneration from leaves of *Ulmus* x ‘Commelin’. ISHS Acta Horticulturae 520: XXV International Horticultural Congress, Part 10: Application of Biotechnology and Molecular Biology and Breeding – In Vitro Culture. Brussels, Belgium
- Ben Jouira H, Hassairi A, Bigot C, Dorion N (1998)** Adventitious shoot production from strips of stem in the Dutch elm hybrid ‘Commelin’: plantlet regeneration and neomycin sensitivity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 153-160
- Bernier L, Hubbes M (1994)** Induction and characterization of ultraviolet-sensitive mutants in the elm tree pathogen *Ophiostoma ulmi* (*sensu lato*). *Mycological Research* 98: 943-953
- Bernier L, Yang D, Ouellette GB, Dessureault M (1996)** Assessment of *Phaeotheca dimorphospora* for biological control of the Dutch Elm Disease pathogens, *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Plant Pathology* 45: 609-617
- Bolyard MG, Hajela RK, Sticklen MB (1991^a)** Microprojectile and Agrobacterium-mediated transformation of ‘Pioneer’ elm. *Journal of Arboriculture* 17: 34-37
- Bolyard MG, Srinivasan C, Cheng J, Sticklen M (1991^b)** Shoot regeneration from leaf explants of American and Chinese elm. *HortScience* 26: 1554-1555
- Brasier CM (1979)** Dual origin of recent Dutch Elm Disease outbreaks in Europe. *Nature* 281: 78-79
- Brasier CM (1981)** Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi* (appendix II). In: Stipes RJ Campana RJ (eds.) *Compendium of Elm Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 76-79
- Brasier CM (1991)** *Ophiostoma novo-ulmi*, causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* 115: 151-161
- Brasier CM (2000)** Intercontinental spread and continuing evolution of the Dutch elm disease pathogens. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 61-72
- Brasier CM, Kirk SA (2001)** Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycological Research* 105: 547-554

- Brasier CM, Kirk SA, Tegli S (1995)** Naturally occurring non cerato-ulmin producing mutants of *Ophiostoma novo-ulmi* are pathogenic but lack aerial mycelium. *Mycological Research* 99: 436-440
- Brasier CM, Mehrotra MD (1995)** *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. *Mycological Research* 99: 205-215
- CanLII (Canadian Legal Information Institute) (2005)** Dutch elm disease regulations. Acedido em 27/7/2005 em: <http://www.canlii.org/mb/laws/regu/1998r.213/>
- Cemagref (1999)** GENRES 78, Coordination for conservation, characterization, collection and utilization of genetic resources of European elms. Acedido em 2/8/2005 em: <http://www.cemagref.fr/Informations/Recherch/milieu/tr/projet/geneticresources/>
- Collin E, Bilger I, Eriksson G, Turok J (2000)** The conservation of elm genetic resources in Europe. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 281-293
- Conde P, Loureiro J, Santos C (2004)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Reports* 22: 632-639
- D'Arcy CJ (2000)** Plant Disease Lessons of the American Phytopathological Society: Dutch elm disease. Acedido em 20/7/2005 em: <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/DuthElm/Top.htm>
- Dewar K, Bernier L (1993)** Electrophoretic karyotypes of the elm tree pathogen *Ophiostoma ulmi* (*sensu lato*). *Molecular gene genetics* 238: 43-48
- Domir SC, Schreiber LR, Ichida JM (1991)** Factors affecting growth of *Ophiostoma ulmi* on elm callus tissue. *Journal of Environmental Horticulture* 9: 211-215
- Domir SC, Schreiber LR, Ichida JM, Eshita SM (1992)** Effect of elm selection, explant source and medium composition on growth of *Ophiostoma ulmi* on callus cultures. *Journal of Environmental Horticulture* 10: 59-62
- Domir SC, Sticklen MB, Pijut PM, Bolyard MG, Lineberger RD (1993)** Micropropagation and regeneration of DED-resistant elms using protoplast and tissue culture techniques. In: Sticklen MB, Sherald JM (ed.s) *Dutch Elm Disease Research - Cellular and Molecular Approaches*. Springer-Verlag, New York, pp. 81-88
- Dorion N, Ben Jouira H, Danthu P, Bigot C (1994^a)** Regeneration of plants from protoplasts of *Ulmus* species (elms). In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 29, Plant Protoplasts and Genetic Engineering V*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 172-190
- Dorion N, Bigot C, Neumann P (1994^b)** Evaluation of Dutch Elm Disease susceptibility and pathogenicity of *Ophiostoma ulmi* using micropropagated elm shoots. *European Journal of Forest Pathology* 24: 112-122

- Dorion N, Danthu P, Bigot C (1987)** Multiplication végétative in vitro de quelques espèces d'ormes. Ann. Sci. For. 44: 103-118
- Dorion N, Godin B, Bigot C (1983)** Isolation and culture of leaf protoplasts from *Ulmus* sp., preliminary report. In: Potrykus I Harms CT Hinnen A (eds.). 6th International Protoplast Symposium, Poster Proc., Birkhauser, Basel, pp. 8-9
- Dorion N, Godin B, Bigot C (1993)** Physiological state and clonal variability effects on low temperature storage of in vitro shoot cultures of elms (*Ulmus* sp.). Scientia Horticulturae 56: 51-59
- Dorion N, Hassairi A, Guyon P, Godin B, Bigot C (1995)** In vitro budding ability of woody internode and *Agrobacterium* susceptibility as prerequisites for elm genetic transformation. Journal of Plant Physiology 146: 699-703
- Duchesne LC (1993)** Mechanisms of resistance: can they help save susceptible elms? In: Sticklen MB Sherald JL (ed.s) Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. Springer-Verlag, New York, pp. 239-254
- Dunn CP (2000)** The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dodrecht, London, 361 pp.
- Durzan DJ, Lopushanski SM (1975)** Propagation of American elm via cell suspension cultures. Canadian Journal of Forestry Research 5: 273-277
- Elgersma DM (1981)** Dutch Elm Disease – host susceptibility and resistance. In: Stipes RJ Campana RJ (ed.s) Compendium of Elm Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 17-18
- Elgersma DM, Roosien T, Scheffer RJ (1993)** Biological control of Dutch Elm Disease by exploiting resistance in the host. In: Sticklen MB Sherald JL (ed.s) Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. Springer-Verlag, New York, pp. 188-192
- Elmcare.com (2005)** Customized elm tree care kits. Acedido em 2/12/2005 em:
<http://www.elmcare.com/index.htm>
- EUFORGEN (EUropean FORest GENetic Ressources Programme) (2005^a)** Scattered Broadleaves Network. Acedido em 2/8/2005 em:
http://www.ipgri.cgiar.org/networks/euforgen/Networks/Scattered_Broadleaves/Default.asp
- EUFORGEN (EUropean FORest GENetic Ressources Programme) (2005^b)** Scattered Broadleaves Network, Portugal National Coordinator. Acedido em 2/8/2005 em:
http://www.ipgri.cgiar.org/networks/euforgen/country/default.asp?cty_name=Portugal
- Fenning TM, Gartland KMA, Brasier CM (1993)** Micropropagation and regeneration of english elm, *Ulmus procera* Salisbury. Journal of Experimental Botany 44: 1211-1217

- Fink CVM, Sticklen MB, Lineberger RD, Domir SC (1986)** In vitro organogenesis from shoot tip, internode, and leaf explants of *Ulmus* x 'Pioneer'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7: 237-245
- Gartland KMA, McHugh AT, Crow RM, Garg A, Gartland JS (2005)** 2004 SIVB congress symposium proceeding: biotechnological progress in dealing with Dutch elm disease. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 41: 364-367
- George MW, Tripepi RR (1994)** Cytokinins, donor plants and time in culture affect shoot regenerative capacity of American elm leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 27-36
- Giri CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004)** Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees* 18: 115-135
- GM trees fight DED (2001)** BBC News. Acedido em 2/9/2001 em: <http://news.bbc.co.uk/1/hi/scotland/1512210.stm>
- Guries RP, Smalley EB (2000)** Once and future elms: classical and molecular approaches to DED resistance. In: Dunn CP (ed.) *The Elms: Breeding Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 231-248
- Harvengt L, Dumas E, Meier-Dinkel A, Collin E (2004)** Establishment of a cryopreserved gene bank of European Elms. *Canadian Journal of Forestry Research* 34: 43-55
- Haugen L (1998)** How to identify and manage Dutch elm disease. Acedido em 26/8/2005 em: http://na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht_ded/ht_ded.htm
- Heybroek HM (1993)** The Dutch elm breeding program. In: Sticklen MB Sherald JL (ed.s) *Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches*. Springer-Verlag, New York, pp. 16-25
- Heybroek HM (2000)** Notes on elm breeding and genetics. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 249-258
- Hiratsuka Y, Takai S (1978)** Morphology and morphogenesis of synnemata of *Ceratocystis ulmi*. *Canadian Journal of Botany* 56: 1909-1914
- Holmes FW (1981)** Dutch Elm Disease – the pathogen. In: Stipes RJ Campana RJ (eds.) *Compendium of Elm Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 9-11
- Holmes FW (1990)** Seven Dutch women scientists whose early research is basic to our knowledge of the “Dutch Elm Disease”. In: Holmes FW Heybroek HM (ed.s) *Dutch Elm Disease – The Early Papers*. The American Phytopathological Society, Minnesota, pp. 1-7
- Hubbes (2000)** The American Elm and Dutch Elm Disease. Acedido em 2/12/2005 em: <http://elmcare.com/community/research/hubbes1.htm>

- Hubbes M (1993)** Mansonones, elicitors and virulence. In: Sticklen MB Sherald JL (ed.s) Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. Springer-Verlag, New York, pp. 209-215
- Jeffers JNR (1999)** Leaf variegation in the genus *Ulmus*. Forestry 72: 183-190
- Kansas State University (2004)** Problem: Dutch elm disease - *Ophiostoma ulmi*. Acedido em 25/2/2005 em: http://www.oznet.ksu.edu/dp_hfrr/extensn/problems/dtchelm.htm
- Kapaun JA, Cheng Z (1997)** Plant regeneration from leaf tissues of siberian elm. HortScience 32: 301-303
- Karnosky DF, Podila GK (1993)** Elm improvement via biotechnological methods. In: Sticklen MB Sherald JL (ed.s) Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. Springer-Verlag, New York, pp. 75-80
- Lanier GN (1989)** Trap trees for control of Dutch elm disease. Journal of Arboriculture 15: 105-111
- Lanier GN, Peacock JW (1981)** Dutch Elm Disease - vectors of the pathogen. In: Stipes RJ Campana RJ (ed.s) Compendium of Elm Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 14-16
- Merkle SA, Dean JFD (2000)** Forest tree biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 11: 298-302
- Navarro C, Castroviejo S (1993)** LXI Ulmaceae. In: Castroviejo S Aedo C Cirujano S Laínz M Montserrat P Morales R Muñoz Garmendia F Navarro C Paiva J Soriano C (ed.s) Flora Ibérica, Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Real Jardín Botánico, Madrid, pp. 244-250
- Pijut PM, Domir SC, Lineberger RD, Schreiber LR (1990)** Use of culture filtrates of *Ceratocystis ulmi* as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. Plant Science 70:191-196
- Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005)** Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 287-300
- Redenbaugh MK, Karnosky DF, Westfall RD (1981)** Protoplast isolation and fusion in three *Ulmus* species. Canadian Journal of Botany 59: 1436-1443
- Redenbaugh MK, Westfall RD, Karnosky DF (1980)** Protoplast isolation from *Ulmus americana* L. pollen mother cells, tetrads and microspores. Canadian Journal of Forestry Research 10: 284-289
- Richens RH (1983)** *Elm*. Cambridge University Press, Cambridge, 347 pp.

- Schreiber LR, Domir SC (1994)** Efficacy of criteria to identify aggressiveness in *Ophiostoma ulmi* and resistance in American elm germ plasm. *Plant Disease* 78: 629-632
- SDEDA (Saskatchewan Dutch Elm Disease Association) (2005)** Preserving the American Elm in Saskatchewan. Acedido em 28/9/2005 em: <http://www.sdeda.ca>
- Shi JL, Brasier CM (1986)** Experiments on the control of Dutch elm disease by injection of *Pseudomonas* species. *European Journal of Forest Pathology* 16: 280-292
- Smalley EB, Guries RP (2000)** Asian elms: sources of disease and insect resistance. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 215-230
- Solla A, Burón M, Iglesias S, Gil L (2000)** Spanish program for the conservation and breeding of elms against DED. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 295-303
- Sousa A, Conde P, Caldeira G (1996)** Micropropagação do ulmeiro (*Ulmus minor*). X Congresso Nacional de Bioquímica, Universidade do Minho, Braga, 31 de Outubro a 2 de Novembro. P 7-28, pg. 75
- Sousa A, Conde P, Santos C, Correia M, Costa A, Caldeira G (1998)** Micropropagation and regeneration of *Ulmus minor* Mill.. Biotech'98, Guimarães, 12 a 15 de Julho
- Stennes MA (2000)** Dutch Elm Disease chemotherapy with Arbotect 20-S® and Alamo®. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 173-188
- Sticklen MB, Domir SC, Lineberger RD (1986)** Shoot regeneration from protoplasts of *Ulmus* x 'Pioneer'. *Plant Science* 47: 29-34
- Sticklen MB, Hajela RK, Bolyard MG, Graham LS, Sherald JL (1994)** Genetic transformation in *Ulmus* species (elms). In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 29, *Plant Protoplasts and Genetic Engineering V*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 401-410
- Sticklen MB, Lineberger RD, Domir SC (1985)** Isolation and culture of protoplasts of *Ulmus* x 'Homestead'. *Plant Science* 41: 117-120
- Sticklen MB, Sherald JL (1993)** Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. Springer-Verlag, New York, 344 pp.
- Stipes RJ (2000)** The management of Dutch Elm Disease. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 157-172
- Stipes RJ, Campana RJ (1981)** Compendium of Elm Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 96 pp

- Temple B, Horgen PA (2000)** Biological roles for cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the elm pathogens, *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mycologia* 92: 1-9
- Temple B, Horgen PA, Bernier L, Hintz WE (1997)** Cerato-ulmin a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch Elm Disease, is a parasitic fitness factor. *Fungal Genetics and Biology* 22: 39-53
- Townsend AM (2000)** USDA genetic research on elms. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 271-278
- Ware GH (2000)** The promise and the future of urban elms: a personal perspective. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 331-339
- Warren K (2000)** The return of the elm: status of elms in the nursery industry. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 341-348
- Webber J (2000)** Insect vector behavior and the evolution of Dutch Elm Disease. In: Dunn CP (ed.) *The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 47-60
- Wiegrefe PM, Sytsma KJ, Guries RP (1994)** Phylogeny of elms (*Ulmus*, Ulmaceae): molecular evidence for a sectional classification. *Systematic Botany* 19: 590-612
- Wiegrefe SJ, Guries RP, Smalley EB, Sytsma KJ (1993)** Genetic diversity in elms: what molecular data tell us. In: Sticklen MB, Sherald JL (ed.s) *Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches*. Springer-Verlag, New York, pp. 227-238
- Yang D, Hubbes MJR, Jeng RS, Hubbes M (1994)** A glycoprotein isolated from culture filtrates of *Ophiostoma ulmi* as a mansonone-inducing elicitor on elm callus. *Mycological Research* 98: 295-300
- Yang D, Jeng RS, Hubbes M (1989)** Mansonone accumulation in elm callus induced by elicitors of *Ophiostoma ulmi*, and general properties of elicitors. *Canadian Journal of Botany* 67: 3490-3497

Capítulo 2

Produção de plantas por cultura de segmentos nodais de *Ulmus minor* Mill.

Parte do trabalho apresentado neste capítulo foi submetido para publicação:

Conde P, Sousa A, Costa A, Santos C. (2007) An efficient protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization (submetido a Plant Cell Tissue and Organ Culture)

2 Produção de plantas por cultura de segmentos nodais de *Ulmus minor* Mill.

Sumário

O objectivo deste capítulo foi estabelecer *in vitro* um protocolo de produção de plantas a partir de segmentos nodais de ulmeiros adultos. Para isso, segmentos distais e basais de rebentos de material de campo, abrolhados em estufa, foram cultivados em dois meios de cultura anteriormente empregues, com este propósito, para outras espécies do género *Ulmus*. Um desses meios foi designado como DKW1 e tinha como base o meio DKW (Driver e Kuniyuki 1984) e o outro, designado como D2, tinha como base o meio MS (Murashige e Skoog 1962). O meio DKW1 provou ser superior a D2 na formação de rebentos de vários indivíduos de *U. minor* e forneceu uma percentagem de proliferação de rebentos, a partir dos segmentos distais, igual a 88,5%. Numa segunda fase, rebentos das culturas em DKW1 foram submetidos ao processo de enraizamento *in vitro* utilizando ANA e AIB como auxinas. Uma elevada percentagem de enraizamento foi obtida para todas as condições testadas (80 a 100%). No entanto, uma delas foi seleccionada por satisfazer a todos os parâmetros analisados. Na etapa final, tanto os rebentos anteriormente enraizados *in vitro* como os rebentos das culturas em proliferação no meio DKW1 foram envasados. A utilização de rebentos com caule grosso e folhas endurecidas permitiu uma percentagem de estabelecimento de 88,6%, sendo desnecessária a etapa de enraizamento prévio *in vitro*. Parte das plantas assim conseguidas foram posteriormente transferidas para terreno aberto, obtendo-se uma percentagem de sobrevivência de 100%.

2.1 Introdução

O primeiro trabalho, de que existe conhecimento, que refere a produção de rebentos *in vitro* do ulmeiro remonta a 1975 e foi realizado por Durzan e Lopushanski (1975) utilizando o ulmeiro Americano. Posteriormente, muitos outros trabalhos de micropropagação vieram a realizados. Em 1986 surgiu o primeiro trabalho efectuado com o híbrido resistente libertado pelo US National Arboretum, *Ulmus* x Pioneer. Nesse trabalho foram obtidos rebentos a partir de ápices caulinares e de folhas deste híbrido (Fink et al. 1986). Seguidamente, em França, foi também desenvolvido um trabalho nesta linha que incluía algumas espécies Europeias. A partir de pequenos rebentos e de segmentos nodais foram obtidos rebentos das espécies *U. campestris*, *U. effusa*, *U. pumila* e dos híbridos Holandeses ‘Dodoens’, ‘Vegeta’ e ‘Commelin’. Estes rebentos foram enraizados em meio sem reguladores de crescimento ou com 0,5 mg/l de AIB (Dorion et al. 1987), sempre utilizando o meio MS como meio basal. No seguimento deste primeiro trabalho, este grupo testou ainda a influência da criopreservação dos rebentos *in vitro* quanto à sua capacidade de proliferação e enraizamento após a sua retirada do frio (Dorion et al. 1993). Nesse mesmo ano, surgiu a publicação de um trabalho de micropropagação do ulmeiro Inglês, *U. procera*. Desta vez, como fonte de material para a propagação dos rebentos os autores utilizaram pequenos rebentos e folhas provenientes de plantas mantidas em estufa (Fenning et al. 1993). Este trabalho distinguiu-se dos trabalhos anteriores porque o meio de cultura utilizado tinha como base o meio de Driver e Kuniyuki (1984) (DKW) enquanto, nos outros trabalhos, o meio base era o de Murashige e Skoog (1962) (MS). Tendo em mente futuros trabalhos de transformação genética, estes autores testaram a sensibilidade do processo de regeneração e proliferação do ulmeiro Inglês aos antibióticos comumente usados com aquela finalidade. A atenção dos investigadores começava, por esta altura, a centrar-se neste objectivo porque os processos de cruzamento tradicionais eram demorados e a transformação genética estava a mostrar potencialidades de transferência directa de resistência à grafiose (Karnosky e Podila 1993; Sticklen et al. 1994).

O primeiro trabalho, realizado com aquele objectivo, tinha sido apresentado por Bolyard et al. (1991). Nesse trabalho, o calo proveniente de secções inter-nodais foi transformado, mas a regeneração de rebentos foi apenas ocasional. Posteriormente, vários trabalhos de regeneração de rebentos foram realizados como etapa base de concretização

daquele objectivo. O grupo Francês de Dorion realizou vários trabalhos neste campo usando o híbrido Holandês ‘Commelin’. Em dois destes trabalhos, os autores usaram secções inter-nodais, recolhidas no campo, para a regeneração de rebentos a partir da zona cambial destes explantes (Dorion et al. 1995; Ben Jouira et al. 1998). Apesar de todos estes esforços, no sentido do desenvolvimento de eficientes sistemas de regeneração de plantas para posterior aplicação das técnicas de transformação, o primeiro grupo a referir a obtenção de ulmeiros geneticamente modificados foi o de Gartland da Universidade de Dundee, na Escócia, que trabalhou com o ulmeiro Inglês (*U. procera*). Este grupo iniciou os seus estudos em 1992 e publicou em 2001 (GM trees fight DED, 2001) a obtenção de ulmeiros geneticamente modificados. Quatro anos mais tarde, estes ulmeiros estavam já a ser testados quanto à sua resistência ao fungo que provoca a grafiose (Gartland et al. 2005). Ao longo destes anos de pesquisa, esta equipa publicou diversos trabalhos sobre as várias etapas desenvolvidas no estabelecimento de um protocolo eficiente de transformação genética do ulmeiro (Fenning et al. 1993; Fenning et al. 1996; Gartland et al. 2000; 2001; 2005).

Apesar da existência de todos os estudos acima citados, o interesse na micropropagação do ulmeiro permanece e recentemente foram publicados mais dois trabalhos. Biroscíková et al. (2004) apresentaram um trabalho de proliferação e enraizamento de rebentos de *U. glabra* a partir de árvores adultas. Harvengt et al. (2004) publicaram um estudo que abrangeu a criopreservação de vários clones da colecção de ulmeiros Europeus do projecto RESGEN 78. Botões dormentes de Inverno de *U. minor*, *U. glabra* e *U. laevis* foram congelados e posteriormente introduzidos *in vitro* provando-se que o congelamento em azoto líquido não teve um efeito negativo na sua micropropagação, relativamente a material não criopreservado. Neste estudo os autores enfatizaram o facto de ser necessário estabelecer um eficiente sistema de micropropagação para a recuperação dos indivíduos, após o seu congelamento, sendo esta a melhor forma de manutenção de colecções de ulmeiros.

O objectivo deste capítulo foi implementar um eficiente sistema de multiplicação *in vitro* a partir de indivíduos adultos, usando para isso meios de cultura já testados para o género. Numa segunda fase, pretendeu-se comparar o processo de enraizamento *in vitro* com a aclimatização directa em substrato, para determinar qual a via mais favorável para a obtenção de plantas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Selecção do local e de árvores para colheita

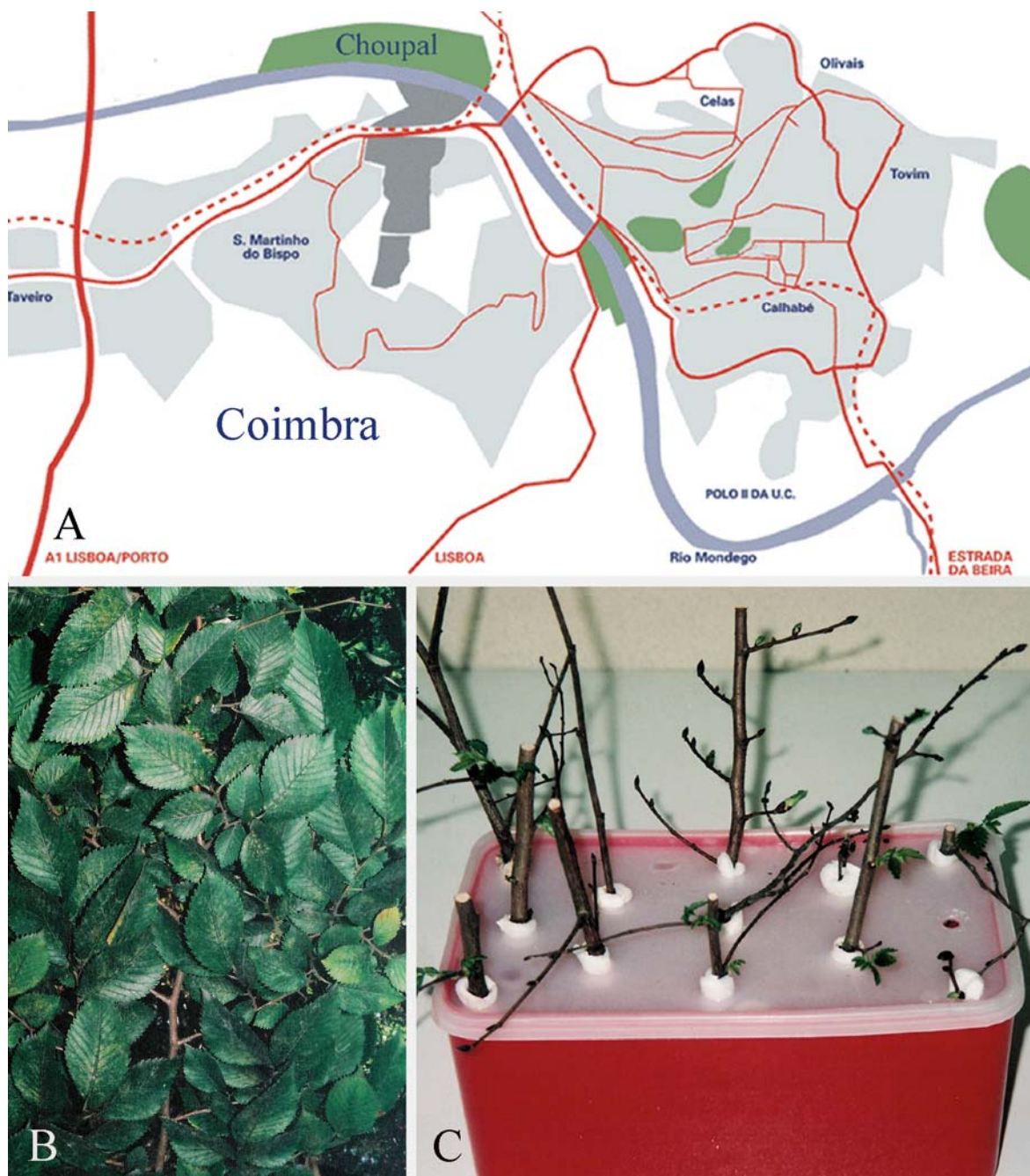


Figura 2.1 (A) Mapa de localização da Mata Nacional do Choupal, em Coimbra, onde foram realizadas as colheitas. (B) Ramo de um ulmeiro no Choupal. (C) Estacas de ramos dormentes em abrolhamento na estufa, uma semana depois da sua colheita e colocação em água.

O local eleito para as colheitas foi a Mata Nacional do Choupal em Coimbra (Fig. 2.1A e 2.1B), dadas as favoráveis condições de acessibilidade e de marcação dos indivíduos. As árvores marcadas foram seleccionadas pelas características distintas que exibiam em relação à morfologia da copa, morfologia das folhas e textura do ritidoma. Simultaneamente, houve a necessidade de selecção de árvores localmente afastadas para que a possibilidade de eleição de indivíduos pertencentes a um mesmo genótipo, devido à reprodução por rebentos de raiz, fosse minimizada. As árvores eleitas possuíam de altura entre 20 a 30 m e de DAP (diâmetro à altura do peito) entre 20 e 85 cm tendo, a maior parte destas, um DAP entre 20 a 40 cm. No total, foram seleccionadas e marcadas 19 árvores. Após estudos iniciais, foi seleccionado um genótipo, F14, que se distinguiu pelo seu comportamento *in vitro*. Posteriormente, todos os ensaios foram efectuados com material clonado desta árvore ou de outras, para comparação das respostas.

2.2.2 Produção de rebentos a partir de segmentos distais e basais

2.2.2.1 Preparação dos explantes

Inicialmente, utilizou-se como fonte de material ramos jovens colhidos durante a Primavera e Verão de 1995. No entanto, devido à elevada taxa de contaminação, este método teve de ser abandonado e optou-se pela utilização de ramos colhidos entre Janeiro e Março de 1996. O material utilizado foi obtido a partir de estacas destes ramos com cerca de 15 a 20 cm de comprimento e, pelo menos, 1 cm de diâmetro (Fig. 2.1C). Estas estacas foram colocadas na estufa, em orifícios individuais abertos em tampas de caixas de plástico que continham água da torneira. Cerca de uma semana após a sua imersão começavam a surgir pequenos rebentos que variavam entre 1 e 5 cm de altura (Fig. 2.1C). Os rebentos obtidos foram desinfectados com etanol a 70% (v/v), durante 30 segundos, e lixívia comercial (Neoblanc®) a 20% (v/v) com 0,01% (v/v) de Teepol®, durante 15 min. Após este período, os rebentos foram três vezes lavados em água destilada, estéril. Depois de desinfectados, estes rebentos foram divididos em segmentos nodais de 2 a 3 cm que continham o ápice caulinar e 1 ou 2 gomos axilares (segmento distal) e segmentos de cerca de 1,5 cm que continham apenas um gomo axilar (segmento basal).

2.2.2.2 Cultura de segmentos distais e basais

Os explantes de nove ulmeiros, obtidos como anteriormente descrito, foram cultivados em dois meios previamente utilizados para outras espécies de ulmeiro. A composição destes meios e as suas referências estão indicadas na Tabela 2.1. Para este estudo, os grupos de explantes foram cultivados em matrizes de 250 ml de capacidade com o meio DKW1 e em matrizes de 50 ml com o meio D2. Todo o procedimento foi realizado três vezes e, em cada um dos meios, foram utilizadas 50 réplicas de segmentos distais e 31 réplicas de segmentos basais, contendo cada uma entre 4 a 6 explantes. O número total de explantes foi de 221 segmentos distais em DKW1 para 227 em D2 e de 151 segmentos basais em DKW1 para 131 em D2. O material foi colocado em sala de cultura com um fotoperíodo de 16 horas, uma intensidade luminosa de $62 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. A taxa de multiplicação de rebentos foi determinada tendo em conta o número de novos rebentos com uma altura mínima de 2 cm, formados por explante individual, cinco semanas após a cultura inicial. Paralelamente, foi contabilizado o número de raízes formadas.

Tabela 2.1 Descrição da composição dos meios de cultura, D2 e DKW1, utilizados na micropropagação de ulmeiro a partir de segmentos distais e segmentos basais

	D2 (Dorion et al. 1987)	DKW1 (Fenning et al. 1993)
Composição salina	Macro MS + Micro Heller (1953)	DKW
Composição orgânica	Vitaminas Morel e Wetmore (1951)	DKW
Reguladores de crescimento	0,5 mg/l AIB (2,5 μM AIB)	1 mg/l BAP + 0,01 mg/l AIB (4,4 μM BAP + 0,05 μM AIB)
Sacarose	30 g/l	30 g/l
Agar	7 g/l	7 g/l
pH	5,5	5,7

MS – Murashige e Skoog (1962); DKW - Driver e Kuniyuki (1984)

Depois deste primeiro ensaio, foi realizado um outro para testar a influência do genótipo no tipo e no número de rebentos formados. Para isso, segmentos distais dos ulmeiros F4, F7, F13, F14 foram cultivados nos meios DKW1 e D2. Para cada ulmeiro foram realizadas várias réplicas cujo número variou conforme o material fornecido por abrolhamento. Todo o procedimento decorreu como descrito acima e foi repetido duas vezes.

Posteriormente, dado o elevado alongamento e proliferação dos rebentos no meio DKW1, foram utilizados frascos de vidro de 600 ml de capacidade com 15 cm de altura e as subculturas foram realizadas com um período de 8 semanas.

2.2.3 Enraizamento *in vitro* dos rebentos micropropagados

Tabela 2.2 Descrição da composição dos meios utilizados no enraizamento *in vitro* de rebentos obtidos das culturas em proliferação no meio DKW1

	DKW0,5ANA	DKW0,5AIB	DKW3ANA/src	DKW3AIB/src	DKWsrc
Composição salina	DKW	DKW	DKW	DKW	DKW
Composição orgânica	DKW	DKW	DKW	DKW	DKW
Reguladores de crescimento	4 semanas em 0,5 mg/l ANA	4 semanas em 0,5 mg/l AIB	1 semana em 3 mg/l ANA + 3 semanas em DKWsrc	1 semana em 3 mg/l AIB + 3 semanas em DKWsrc	4 semanas em DKWsrc
Sacarose	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Agar	7 g/l	7 g/l	7 g/l	7 g/l	7 g/l
pH	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7

DKW - Driver e Kuniyuki (1984)

Neste estudo foram utilizados rebentos das culturas em proliferação no meio DKW1, dezoito meses após a cultura dos explantes primários. Cinco diferentes meios e duas condições de cultura foram testados neste ensaio (Tabela 2.2). O meio basal de DKW,

sem reguladores de crescimento, foi usado como controle e os outros quatro meios foram suplementados com AIB ou ANA. Em dois desses meios, cada uma das auxinas foi adicionada na concentração de 0,5 mg/l e os rebentos foram mantidos nestes meios durante 4 semanas. Na outra condição, os rebentos foram colocados nos meios com cada uma das auxinas, na concentração de 3 mg/l, durante apenas 1 semana, sendo depois transferidos para meio basal onde permaneceram durante as restantes 3 semanas. Os rebentos controle foram mantidos durante as 4 semanas em meio basal.

Os rebentos, com cerca de 5 cm de altura, foram cultivados em tubos de cultura. Em cada tubo foi apenas cultivado um rebento e nos dois ensaios foram utilizados 30 rebentos para cada um dos meios. Os tubos foram colocados em suportes a uma temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a uma intensidade luminosa de $62 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ com um fotoperíodo de 16 horas. Após cada semana em cultura, foi determinado o número de rebentos que regeneravam raízes, o número de raízes por rebento, o comprimento das raízes e a sua morfologia. Paralelamente, foi avaliada a formação de calo basal.

2.2.4 Aclimatização

2.2.4.1 Aclimatização de plantas enraizadas *in vitro*

Neste ensaio foram aclimatizadas plantas provenientes do enraizamento *in vitro* no meio DKW3AIB/src. Após cinco semanas de permanência no meio agarizado, 59 plantas foram individualmente transferidas para os vasos com substrato. O substrato utilizado consistia numa mistura estéril de turfa e perlite na proporção de 3:2 (v/v) e foi colocado em vasos com 500 ml de capacidade, após ter sido autoclavado. As raízes foram lavadas com água estéril, para eliminar os restos de meio de cultura, e as folhas que tocavam o substrato foram removidas. As plantas foram colocadas nos vasos, inserindo o sistema radicular num orifício central feito no substrato, deixando as raízes o mais estendidas possível. O conjunto vaso + planta foi posteriormente aspergido com uma solução de Benlate® a 1g/l com repetição deste procedimento, quando necessário, para evitar o desenvolvimento de fungos. Nos primeiros dias, as plantas foram pulverizadas, sempre que necessário, para que as folhas não murchassem. O teor de humidade relativa foi gradualmente diminuído,

aumentando a abertura da câmara de aclimatização e reduzindo o número de pulverizações. As plantas continuaram o seu crescimento na estufa sujeitas a um fotoperíodo de 16 h de luz emitida por conjuntos de lâmpadas Osram que irradiam em média $444 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. A temperatura da estufa era de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e a humidade relativa de cerca de 85%.

2.2.4.2 Aclimatização directa de rebentos micropropagados

Neste ensaio, rebentos de 10 cm de altura foram retirados das culturas no meio DKW1 e foram enraizados directamente no substrato. Pelas suas características estes rebentos foram divididos em dois grupos. Num deles foram incluídos os rebentos com caule mais fino e folhas pouco endurecidas (rcf) e no outro foram incluídos os rebentos com caule mais grosso e folhas endurecidas (rcg). O ápice caulinar e as folhas presentes nos dois terços mais basais destes rebentos foram removidos (Fig. 2.6A). A influência do AIB como auxina foi testada colocando metade dos rebentos em presença desta e actuando a outra metade como controlo. Os 2 cm basais dos rebentos foram imersos numa solução com 10 mg/l de AIB durante 20 h, e os rebentos controlo foram colocados em água destilada. Foram realizados dois ensaios com 3 a 4 rebentos por réplica (vasos de 500 ml) com, pelo menos, 16 réplicas para cada um dos tratamentos que perfizeram um total de 225 rebentos. Os rebentos foram enterrados no substrato que consistia numa mistura de turfa e perlite na proporção de 3:2 (v/v). Todo o restante procedimento foi igual ao acima descrito.

2.2.5 Análise estatística

Todos os valores percentuais foram transformados pela função $\arcsen\sqrt{x}$ ($\text{ASIN}(\text{SQRT}(X/100))$) antes de serem tratados estatisticamente, mas são aqui apresentados não transformados. A significância da diferença entre as médias foi analisada pela distribuição t-Student, para $P \leq 0,05$. Antes da aplicação do teste t foi verificada a diferença entre as variâncias empregando o teste de Fisher (teste F), e, quando estas eram significativamente diferentes, foi realizado um teste t aproximado (Dytham 1999). Todos os cálculos foram efectuados usando o programa Microsoft® Excel X para Mac®.

2.3 Resultados

2.3.1 Produção de rebentos a partir de segmentos distais e basais

A introdução *in vitro* de rebentos jovens colhidos no campo durante a Primavera e Verão, provocou uma taxa de contaminação das culturas que variou entre 85 e 100%. Por esta razão, optou-se pela colheita de ramos dormentes, com indução do rebentamento em estufa (Fig. 2.1C), tendo este procedimento permitido uma redução da percentagem de contaminação para valores entre 0 e 10%. Das 19 árvores seleccionadas inicialmente para este estudo, apenas cerca de metade produziram rebentos por abrolhamento. Este resultado deveu-se, principalmente, à idade dos ramos colhidos, uma vez que, de uma forma geral, os ramos mais velhos produziram poucos rebentos, relativamente aos mais novos. Para além disso, notou-se ainda uma influência do genótipo na capacidade de abrolhamento das árvores dado que, mesmo entre os ramos jovens, alguns deles mostraram-se pouco produtivos.

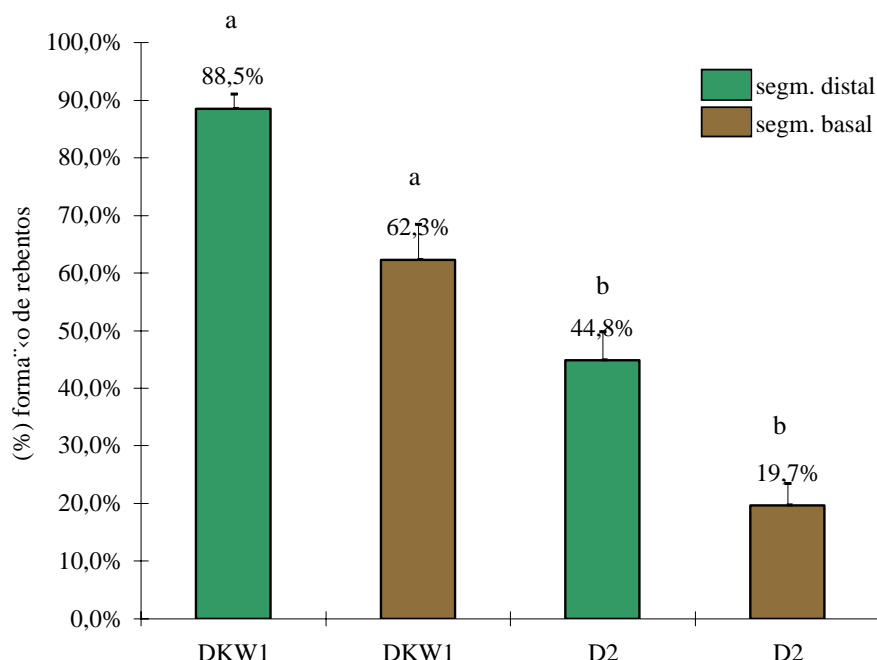


Gráfico 2.1 Percentagem média de formação de rebentos nos dois meios de proliferação utilizados (DKW1 e D2), tendo em conta o tipo de explante. Cada barra apresenta o valor médio e o erro padrão de 31 réplicas de segmentos basais e 50 réplicas de segmentos distais de 9 árvores. Os resultados referem-se a três ensaios independentes e foram registados cinco semanas após a cultura. Os valores das barras, com a mesma cor, assinalados com uma letra diferente são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

O estudo para a selecção do meio de cultura (DKW1 e D2) foi efectuado com segmentos distais e basais de nove ulmeiros adultos. Entre os dois meios testados, o meio com a formulação salina de DKW destacou-se, significativamente, nos dois tipos de explante utilizados. Tendo em conta o tipo de explante utilizado, o segmento distal forneceu sempre resultados significativamente superiores aos obtidos com o segmento basal (Gráfico 2.1). No meio DKW1, os explantes mostraram uma boa capacidade de estabelecimento e proliferação que atingiu valores de 88,5% a partir dos segmentos distais e 62,3% a partir dos segmentos basais. Em D2 a formação de rebentos atingiu um valor de 44,8% usando segmentos distais como explante e 19,7% usando segmentos basais (Gráfico 2.1). No primeiro meio, os rebentos surgiram por alongamento do ápice caulinar e dos gomos axilares que formaram assim ramificações no eixo do explante. No segundo meio, D2, apenas se verificou o crescimento do ápice caulinar. Este meio mostrou possuir uma grande capacidade de enraizamento e a formação de raízes foi sempre necessária para que se verificasse o alongamento do explante. A formação de novos rebentos, por ramificação, somente foi observada quando o ápice caulinar, dos explantes em alongamento, foi eliminado (Fig. 2.2G).

Tabela 2.3 Número de rebentos obtido por cada tipo de explante em cada um dos meios de proliferação. Cada valor é a média \pm erro padrão de 31 réplicas de segmentos basais e 50 réplicas de segmentos distais, cada uma com 4 a 6 explantes. Os resultados referem-se a três ensaios independentes registados 5 semanas após a cultura. Os valores seguidos de uma letra diferente, na mesma linha ou na mesma coluna, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Meios de proliferação	Segmentos distais	Segmentos basais
DKW1	1,6 \pm 0,11 a	0,9 \pm 0,14 b
D2	0,5 \pm 0,06 c	0,2 \pm 0,04 d

Relativamente ao número de rebentos proliferados, os segmentos distais deram origem a um número médio de 1,6 rebentos em DKW1 (Fig. 2.2A e 2.2B), contra o número médio de 0,5 rebentos formados em D2, no mesmo tipo de explante (Fig. 2.2C e 2.2D). Em relação aos segmentos basais, no meio DKW1 (Fig. 2.2E) cada explante deu origem a 0,9 rebentos, em média, enquanto no meio D2 (Fig. 2.2F) em cada segmento basal cultivado apenas foram formados 0,2 rebentos (Tabela 2.3).

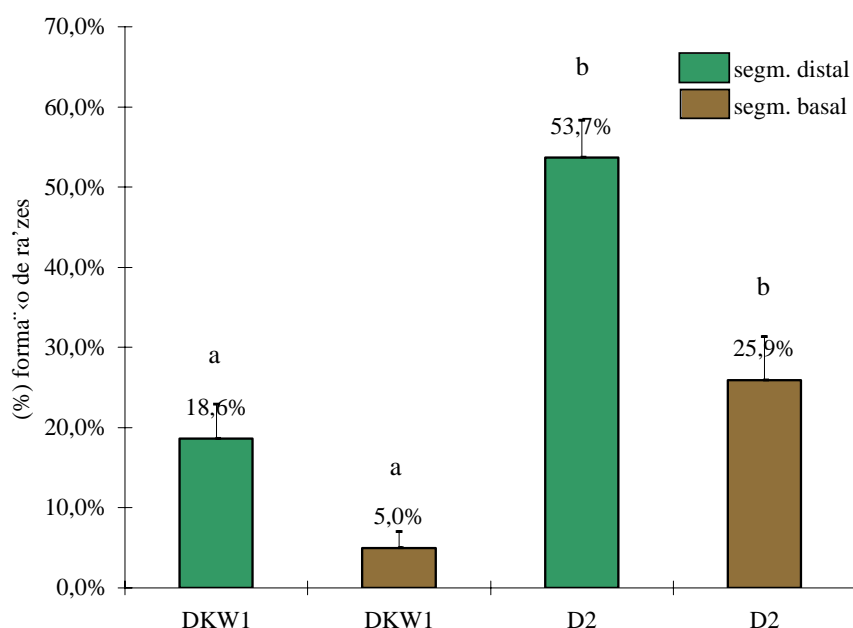
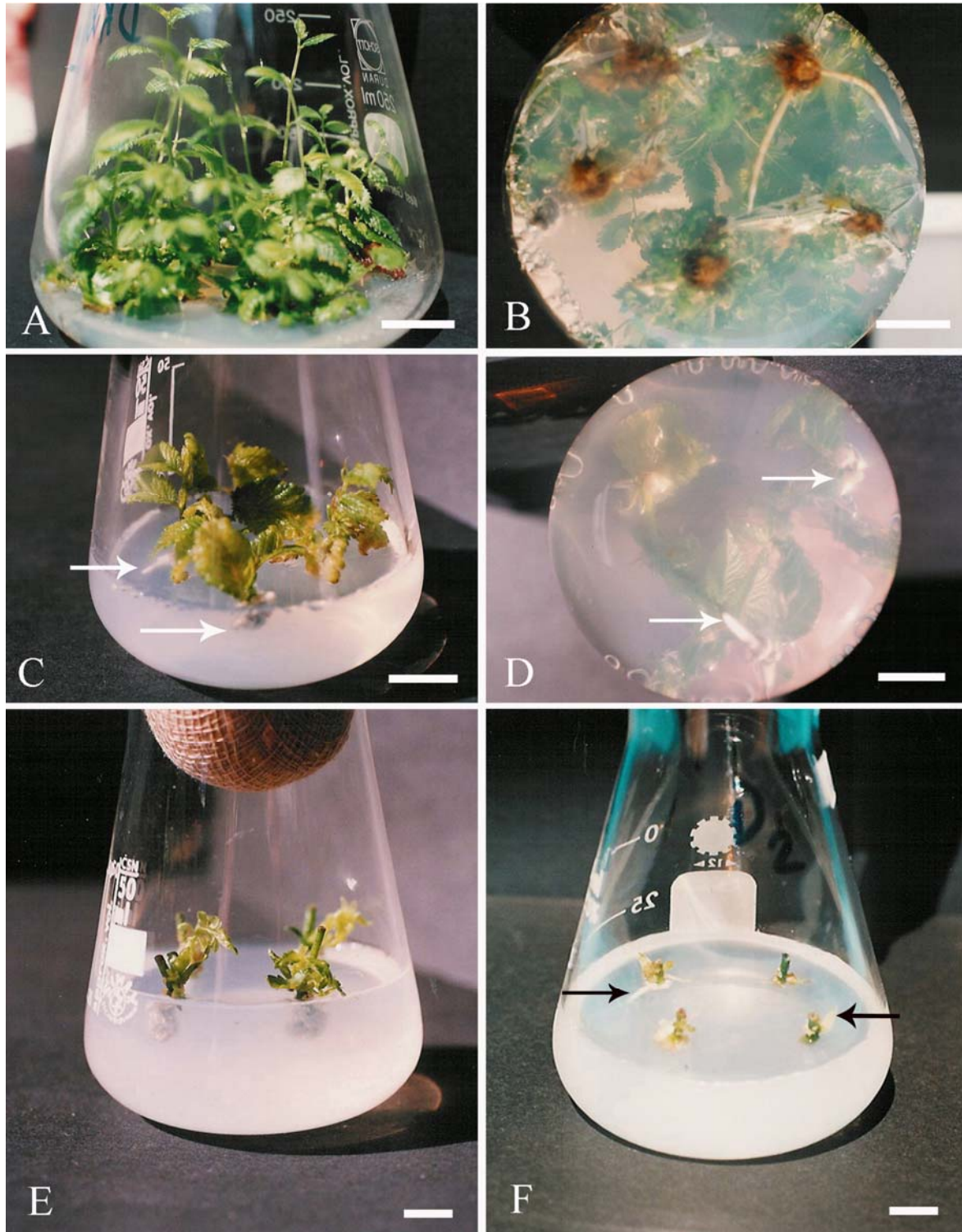


Gráfico 2.2 Percentagem média de formação de raízes nos dois meios de proliferação (DKW1 e D2), tendo em conta o tipo de explante. Cada barra apresenta o valor médio e o erro padrão de 31 réplicas de segmentos basais e 50 réplicas de segmentos distais de 9 árvores. Os resultados referem-se a três ensaios independentes e foram registados cinco semanas após a cultura. Os valores das barras, com a mesma cor, assinalados com uma letra diferente são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Como já referido, o meio D2 mostrou uma acentuada produção de raízes (Fig.s 2.2D e 2.2F). Em DKW1, também houve produção de raízes, mas a uma taxa muito inferior à do meio D2. No meio D2, 53,7% dos segmentos distais produziram raízes contra 18,6% em DKW1 (Gráfico 2.2) variando esta produção, por explante, entre 1 a 8 raízes em D2 (Fig. 2.2G) e 1 a 4 raízes em DKW1 (Fig. 2.2B). Em termos estatísticos, cada segmento distal produziu, em média, 1,33 raízes em D2 contra 0,21 raízes em DKW1, valores estes que foram significativamente diferentes. Diferenças significativas foram também obtidas para os segmentos basais com uma produção média de 0,7 raízes por segmento em D2 contra 0,07 raízes por segmento em DKW1 (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 Número de raízes obtido em cada tipo de explante nos meios de proliferação. O valor é a média \pm erro padrão de 31 réplicas de segmentos basais e 50 réplicas de segmentos distais, cada uma com 4 a 6 explantes. Os resultados referem-se a três ensaios registados 5 semanas após a cultura. Os valores seguidos de uma letra diferente, na mesma linha ou na mesma coluna, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Meios de proliferação	Segmentos distais	Segmentos basais
DKW1	0,21 \pm 0,05 a	0,07 \pm 0,04 b
D2	1,33 \pm 0,19 c	0,70 \pm 0,17 d



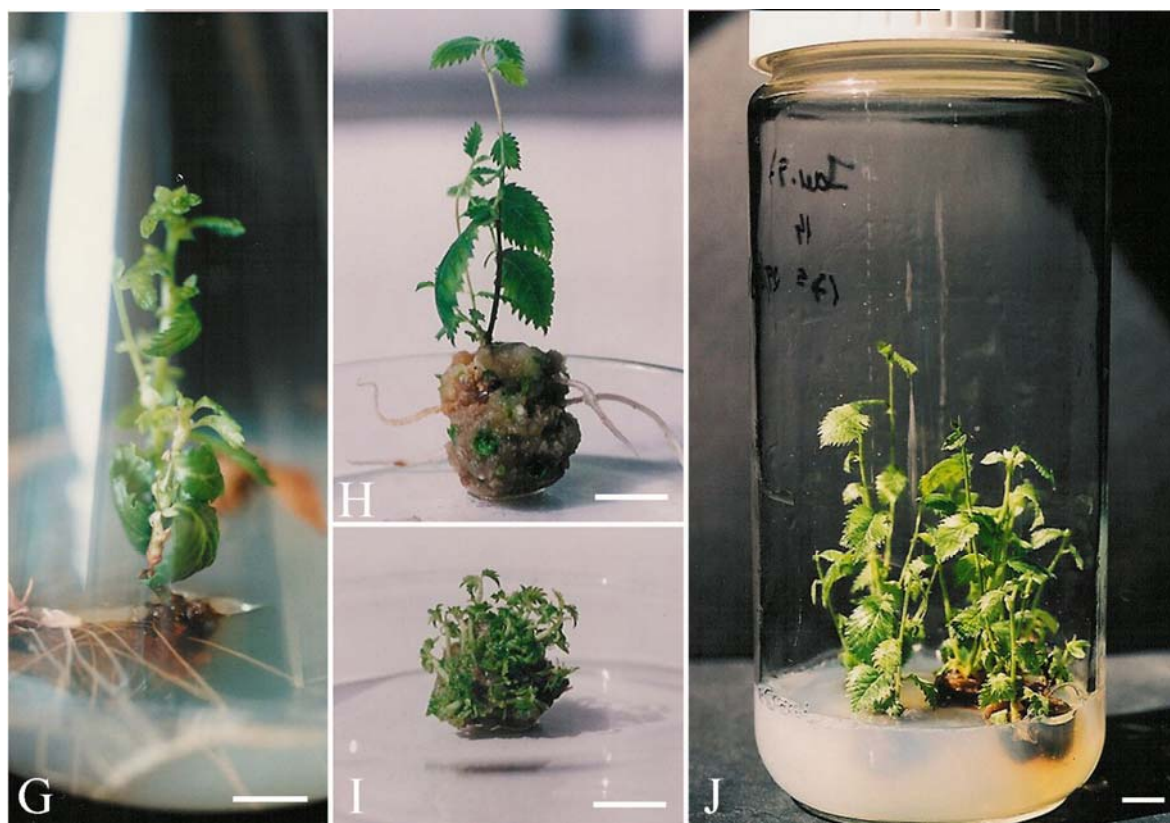


Figura 2.2 Proliferação de rebentos nos meios DKW1 e D2. (A) Proliferação de rebentos a partir de segmentos distais cultivadas no meio DKW1 durante 5 semanas. (B) Aspecto da base do recipiente anterior (as barras em A e B valem 1,3 cm). (C) Comportamento dos segmentos distais no meio D2 após 5 semanas. (D) Aspecto da base do recipiente anterior em que é evidenciada a existência de raízes (setas) (as barras em C e D valem 1 cm). (E) Proliferação de rebentos a partir de segmentos basais colocados no meio DKW1. (F) Comportamento de segmentos basais colocados no meio D2, em que se verifica apenas a produção de raízes (setas) (as barras em E e F valem 0,6 cm). (G) Formação de rebentos, por ramificação, num segmento distal cultivado no meio D2, depois de o ápice caulinar ter sido removido. (H) Exemplo da produção de rebentos no calo formado num segmento basal, 6 semanas após a sua subcultura para o meio DKW1. (I) Alongamento dos rebentos do calo anterior, após sua subcultura para meio fresco. (J) Recipiente utilizado, rotineiramente, na multiplicação de rebentos no meio DKW1 devido ao seu elevado alongamento (as barras em G – J valem 1 cm); (parte desta figura está situada à esquerda).

Após os estudos iniciais com os meios de proliferação, efectuou-se um ensaio para determinar a influência do genótipo de alguns ulmeiros quanto ao seu comportamento *in vitro*. Para esse estudo foram utilizadas as árvores F4, F7, F13 e F14 porque foram aquelas que, por abrolhamento, forneceram material em quantidade suficiente.

Como se pode verificar pela Tabela 2.5, existiu alguma variação quanto ao número de rebentos formados a partir do material proveniente dos diferentes ulmeiros. Embora, para a maior parte das árvores usadas, essa diferença não fosse significativamente diferente, muitas vezes a maior diferença residiu no comportamento do material quando introduzido *in vitro*. Enquanto alguns ulmeiros mostraram possuir bom potencial para a

formação de rebentos, outros mostraram uma fraca receptividade à cultura produzindo rebentos com calo “espumoso” ao longo do caule ou rebentos com folhas muito pequenas e enroladas e, ainda, rebentos de caules finos e longos segmentos entre os nós. Devido a estes resultados, para os ensaios ulteriores escolheu-se um dos ulmeiros que mostrou bons resultados quanto à regeneração de rebentos e quanto ao seu comportamento *in vitro*. Esse ulmeiro foi o designado como F14.

Tabela 2.5 Número de rebentos produzidos no meio DKW1 e D2 a partir de segmentos distais de 4 ulmeiros. Cada valor é a média \pm desvio padrão de várias réplicas, cada uma com 4 a 6 explantes. Os valores referem-se a dois ensaios independentes, registados 5 semanas após a cultura. Os valores seguidos de uma letra diferente, na mesma coluna, são valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$). Na mesma linha, símbolos diferentes indicam valores significativamente diferentes para o mesmo ulmeiro cultivado nos dois meios ($P \leq 0,05$)

Árvores	Nº médio de rebentos no meio DKW1	Nº médio de rebentos no meio D2
Ulmeiro F4	1,08 \pm 0,37 (48 explantes) a &	0,22 \pm 0,31 (42 explantes) a ə
Ulmeiro F7	1,16 \pm 0,77 (82 explantes) a b &	0,40 \pm 0,36 (47 explantes) a ə
Ulmeiro F13	1,55 \pm 0,73 (52 explantes) a b &	0,59 \pm 0,45 (52 explantes) a b ə
Ulmeiro F14	1,67 \pm 0,94 (65 explantes) b &	0,64 \pm 0,36 (54 explantes) b ə

Devido aos resultados acima apontados, o meio DKW1 foi o escolhido para a proliferação de rebentos de *U. minor*. Para além disso, este meio forneceu ainda material suplementar que não foi incluído nos resultados de multiplicação uma vez que a sua origem era incerta. Cerca de seis semanas após cada subcultura, numerosos rebentos surgiam no calo formado na base dos explantes (Fig. 2.2H). A produção de calo na base dos explantes foi sempre uma constante nos dois tipos de explante utilizados. No entanto, a produção de rebentos neste calo só foi observada em material subcultivado. A transferência do calo para meio fresco promoveu o alongamento dos rebentos tendo-se obtido mais de 20 rebentos por cada base (Fig. 2.2I), com uma frequência de produção (contabilizada nos dois tipos de explante) de 83,0% (n=100). Em observações à lupa verificou-se que a maior parte destes rebentos provinham do gomo que contactava com o meio que ficava coberto de calo. No entanto, verificou-se também que alguns destes rebentos formavam-se a partir do próprio calo. Por esta razão, estes rebentos não foram contabilizados e foram apenas utilizados em ensaios preliminares, dado o elevado número de indivíduos obtidos por esta via.

Com o avançar do tempo de permanência no meio de cultura, o material demonstrou grande capacidade de alongamento (Fig. 2.2J) e de rejuvenescimento, uma vez que, o número de rebentos obtidos por explante aumentava progressivamente. Efectivamente, numa quantificação realizada com as culturas do ulmeiro F14, três anos após a introdução inicial do material *in vitro*, o número de rebentos produzidos foi significativamente superior ao verificado nas culturas primárias. O número médio de rebentos formados foi de $3,06 \pm 0,16$ rebentos ($n = 30$ réplicas de dois ensaios, totalizando 158 segmentos distais) contra $1,67 \pm 0,94$ rebentos da cultura inicial (dados do F14 da Tabela 2.5). A frequência de produção de rebentos também sofreu, após este período, um incremento acentuado uma vez que 99,4% ($\pm 0,56$) dos segmentos distais produziram novos rebentos contra 85,6% ($\pm 5,14$) da cultura inicial, valores estes que também foram significativamente diferentes.

2.3.2 Enraizamento *in vitro* de rebentos

Neste estudo, o objectivo era determinar qual seria o meio de enraizamento que, tendo como base o meio salino de DKW, promoveria uma melhor e maior formação de raízes.

Foram utilizados quatro meios suplementados com as auxinas AIB e ANA, utilizando duas concentrações e duas condições de cultura. Numa delas, os rebentos foram colocados em meio com 3 mg/l, de cada uma das auxinas, durante o período de uma semana e depois foram transferidos para meio de igual constituição, mas sem reguladores de crescimento. Na segunda condição, os rebentos foram colocados continuamente em meios com aquelas auxinas na concentração de 0,5 mg/l. Como controlo, foram colocados rebentos, continuamente, em meio base sem reguladores de crescimento (Tabela 2.2).

Em todos os meios testados, os rebentos formaram raízes e a frequência de produção destas foi aumentando ao longo das quatro semanas de permanência nos meios de enraizamento, sendo esta produção visível logo após as duas primeiras semanas (Gráfico 2.3). Os meios que mostraram uma maior percentagem de enraizamento foram os suplementados com AIB, DKW3AIB/src e DKW0,5AIB, que atingiram valores de 96,7%

e 100,0%, respectivamente, embora todos os meios tenham mostrado uma percentagem de enraizamento elevada (Tabela 2.6 e Gráfico 2.3).

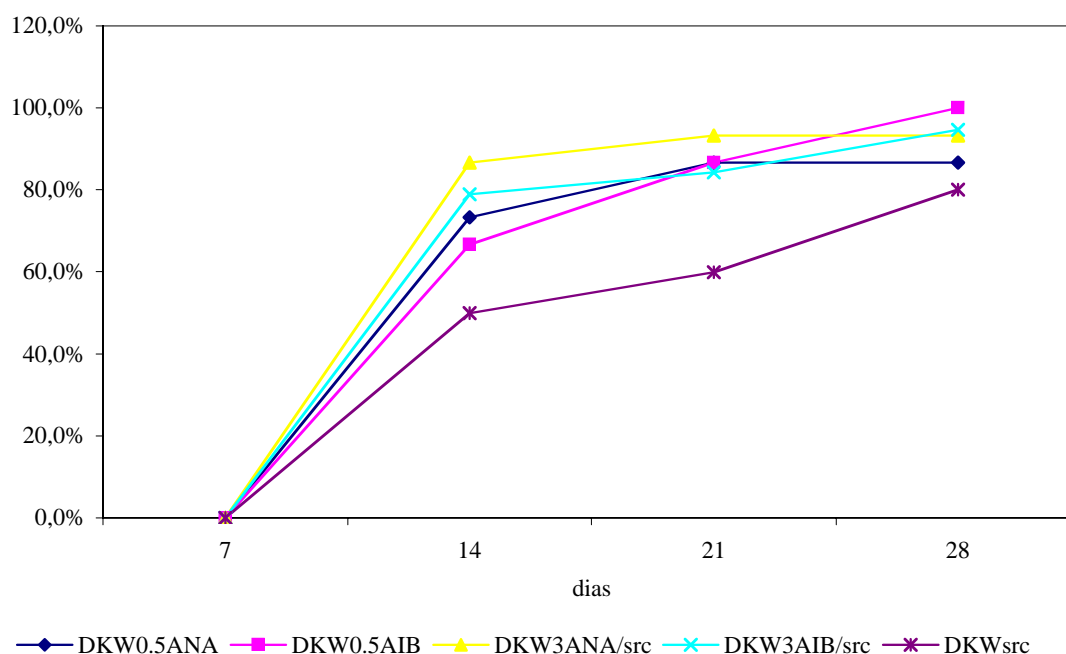


Gráfico 2.3 Evolução da percentagem de rebentos que formaram raízes ao longo de quatro semanas, em cada meio de enraizamento. Todos estes meios têm como meio basal o meio de DKW; (src – sem reguladores de crescimento).

Relativamente ao número médio de raízes produzidas, não se verificaram diferenças significativas entre os meios com AIB e ANA, nas duas concentrações e condições de cultura (Tabela 2.6). De igual modo, não se verificaram diferenças significativas entre os dois meios com ANA como auxina (Tabela 2.6). Valores significativamente diferentes foram encontrados, no entanto, entre os dois meios com AIB. Efectivamente, das quatro situações testadas em presença de auxina, o meio DKW3AIB/src promoveu a maior formação de raízes ($5,07 \pm 0,76$) contra a menor produção ($2,80 \pm 0,34$ raízes) que foi verificada no meio DKW0,5AIB (Tabela 2.6). Isto demonstrou que, para esta auxina, a modificação das condições de cultura, e da sua concentração, desencadeou uma variação nos resultados que não foi verificada nos meios com ANA. Relativamente ao controlo (DKWsrc), os resultados quantitativos, referentes ao número médio de raízes produzidas, foram significativamente inferiores a qualquer um dos valores obtidos com a adição das auxinas (Tabela 2.6).

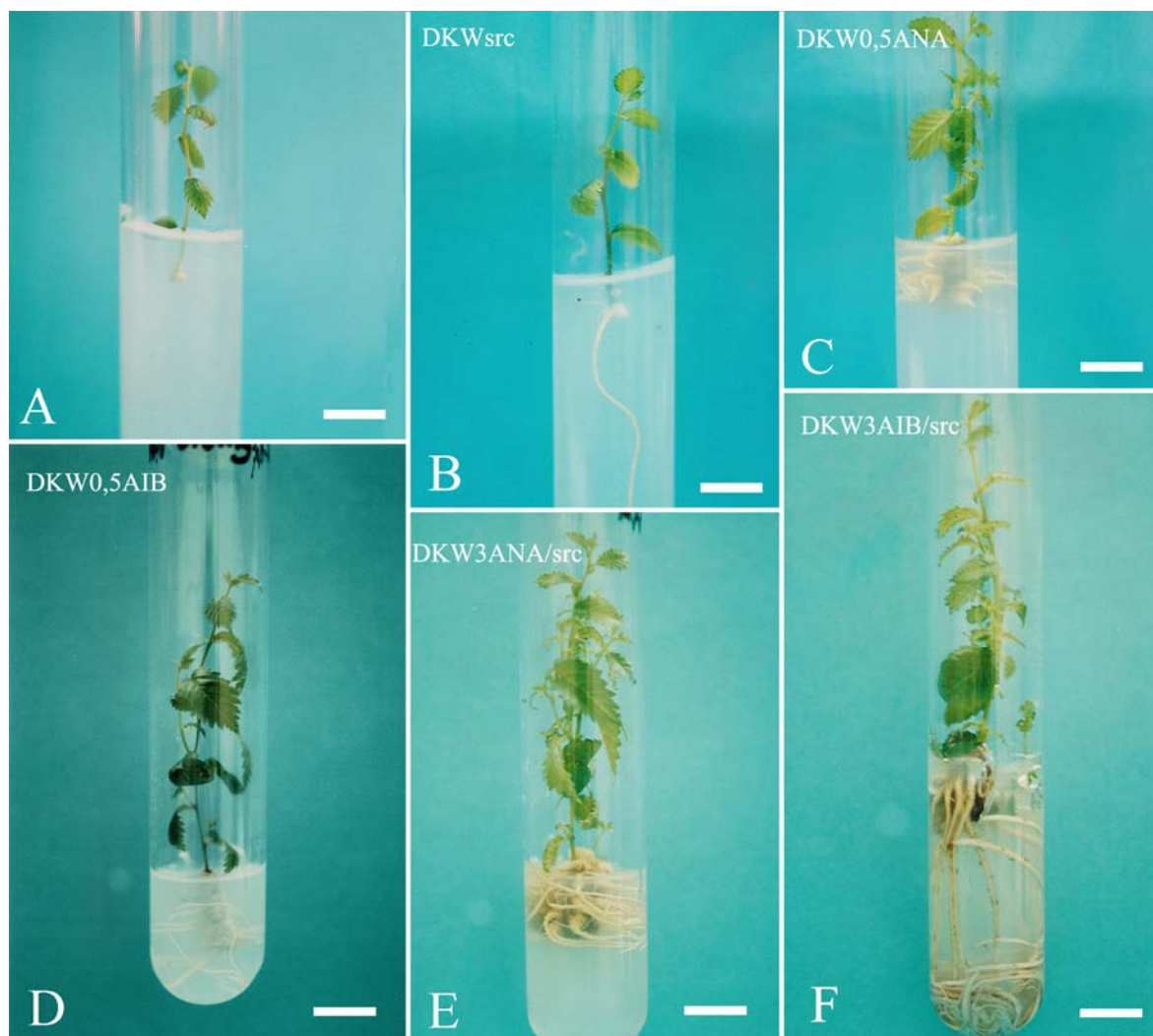


Figura 2.3 Enraizamento *in vitro*. Exemplos de raízes características formadas em cada um dos meios, após 4 semanas. (A) Tipo de rebento utilizado. (B) DKWsrc. (C) DKW0,5ANA (D) DKW0,5AIB. (E) DKW3ANA/src. (F) DKW3AIB/src; (as barras valem 1,4 cm).

Em termos qualitativos os resultados foram muito variáveis (Fig.s 2.3B a 2.3F). As raízes formadas nos meios DKW0,5ANA e DKW0,5AIB eram mais grossas e menos compridas (entre 1 e 1,5 cm) que as formadas nos rebentos colocados apenas uma semana nos meios com 3 mg/l de auxina (entre 1 a 3,5 cm). Nos rebentos colocados no meio DKWsrc as raízes formadas eram ainda mais longas (1,5 a 6 cm) e finas do que as produzidas em qualquer um dos outros meios. Relativamente ao alongamento dos rebentos, verificou-se que os que foram colocados nos meios com 3 mg/l de auxina (DKW3ANA/src e DKW3AIB/src) sofreram um maior alongamento. Nestes meios, no final das quatro semanas, os rebentos atingiram entre 8 a 9 cm de altura contra um máximo de 6 cm nos outros meios. Um outro resultado que surgiu associado ao desenvolvimento de raízes foi a

produção de calo basal. Este resultado foi observado, principalmente, na condição de presença constante de auxina, embora o meio com ANA tenha mostrado uma produção superior à do meio com AIB. Nos meios em que se procedeu a um choque auxínico de uma semana, seguido de transferência para meio sem reguladores de crescimento, a produção de calo basal foi muito inferior à que ocorreu nos meios anteriores mas, ainda assim, superior no meio suplementado com ANA relativamente ao suplementado com AIB.

Tabela 2.6 Resultados do enraizamento de pequenos rebentos *in vitro*, em meios que diferiam na composição e concentração de auxina, utilizando como meio base o meio de DKW. O número de raízes foi determinado quatro semanas após a sua colocação nos meios de cultura. Os valores referem-se ao número médio de raízes produzidas \pm o erro padrão para 30 rebentos colocados em cada uma das condições. Os valores seguidos de letra diferente são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Meios de enraizamento	Número médio de raízes	% Enraizamento
DKW0,5ANA (4 sem. 0,5 mg/l ANA)	$4,27 \pm 0,72$ a b	86,7 %
DKW0,5AIB (4 sem. 0,5 mg/l AIB)	$2,80 \pm 0,34$ a	100,0 %
DKW3ANA/src (1 sem. 3 mg/l ANA + 3 sem. DKWsrc)	$4,80 \pm 0,78$ a b	93,3 %
DKW3AIB/src (1 sem. 3 mg/l AIB + 3 sem. DKWsrc)	$5,07 \pm 0,76$ b	96,7 %
DKWsrc (4 sem.)	$1,20 \pm 0,14$ c	80,0 %

src – sem reguladores de crescimento

Tendo em conta os resultados acima referidos o meio DKW3AIB/src foi eleito como o melhor meio de enraizamento. As razões para esta escolha prenderam-se com o facto de ter sido neste meio que se verificou: 1) uma das maiores percentagens de enraizamento (96,7%); 2) a produção do maior número médio de raízes (5,07 raízes); 3) um bom alongamento dos rebentos e 4) uma baixa produção de calo basal. Posteriormente, foram realizados com este meio os ensaios em que se pretendeu um enraizamento rápido. Quando não foi necessário um enraizamento tão rápido, o meio seleccionado foi o meio basal (DKWsrc) dado que neste meio o objectivo também era atingido, embora a formação de raízes fosse, de uma forma geral, mais tardia e os rebentos demorassem um pouco mais a alongar.

2.3.3 Aclimatização

2.3.3.1 Aclimatização de plantas enraizadas *in vitro*

Após o enraizamento *in vitro* no meio DKW3AIB/src, as plantas foram aclimatizadas a condições de estufa. Em dois dos ensaios efectuados, de 59 plantas transferidas para o substrato 51 já se encontravam totalmente estabelecidas, seis semanas após a transferência. Estes números forneceram, em termos percentuais, um valor igual a 86,4% de plantas estabelecidas naquele período. As plantas aclimatizadas e mantidas em estufa, depois da sua introdução *in vitro*, não mostraram diferenças quanto à morfologia da folha, quando comparadas com a planta-mãe, e mantiveram as características distintas pelas quais a árvore tinha sido eleita no campo. Na Figura 2.4A encontram-se clones da árvore F14 utilizada neste ensaio (à direita) e da árvore F7 (à esquerda), outro ulmeiro que foi enraizado e aclimatizado seguindo o procedimento descrito acima para o F14. No campo, estas árvores apresentavam uma marcada diferença quanto à morfologia das folhas

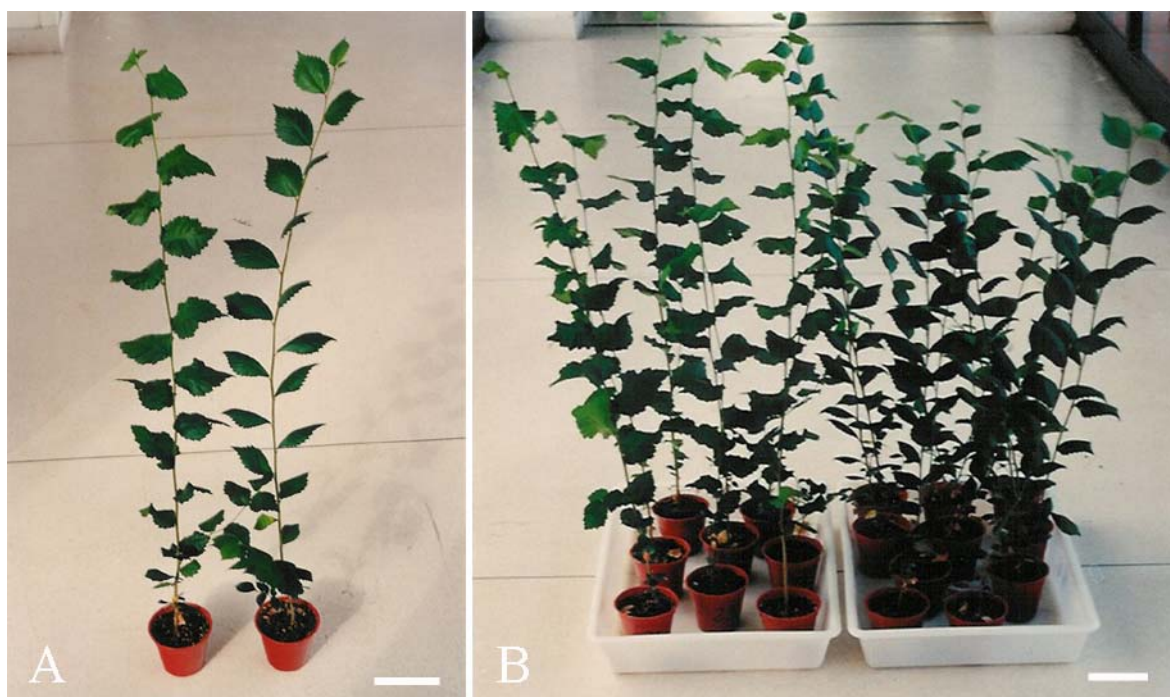


Figura 2.4 Aclimatização das plantas provenientes do enraizamento *in vitro*. (A) e (B) Comparação morfológica entre material proveniente do ulmeiro F14 (à direita) e do ulmeiro F7 (à esquerda), que no campo mostravam características morfológicas distintas que foram mantidas após a introdução *in vitro* (as barras valem 10 cm).

possuindo o ulmeiro F7 folhas de maior dimensão, mais enrugadas e mais finas que as de F14, que eram mais pequenas, mais lisas e mais espessas. Pela observação das Fig.s 2.4A e 2.4B pode-se verificar que estas diferenças foram mantidas após todos os procedimentos.



Figura 2.5 Aclimatização de plantas provenientes do enraizamento em meio basal de DKW e no meio de proliferação, DKW1. (A) Câmara de vidro utilizada para a aclimatização das plantas (a barra vale 10 cm). (B) e (C) Exemplos de plantas completamente estabelecidas e em franco desenvolvimento (as barras valem 5 cm).

As plantas provenientes do enraizamento em meio basal (DKW/src) e aquelas que desenvolveram raízes no meio de micropropagação (DKW1) foram também aclimatizadas seguindo este procedimento (Fig.s 2.5A a 2.5C). Apesar de, nestes casos, não se ter

efectuado um seguimento exaustivo das plantas durante o processo, estas comportaram-se de forma semelhante às enraizadas previamente *in vitro*.

2.3.3.2 Aclimatização directa de rebentos micropropagados

Neste ensaio o objectivo foi o enraizamento e aclimatização simultânea de rebentos das culturas em DKW1. Estes rebentos foram reunidos, segundo as suas características, em dois grupos. Num deles foram colocados os rebentos com caule fino e folhas pouco endurecidas (rcf) e no outro os rebentos com caule mais grosso e folhas endurecidas (rcg) (Fig. 2.6A). A influência do AIB como auxina foi testada neste ensaio. Para isso, metade dos rebentos daqueles dois grupos foram colocados em presença daquele fitoregulador, na concentração de 10 mg/l, enquanto a outra metade dos rebentos funcionou como controlo. Os resultados obtidos foram registados seis semanas após a transferência dos rebentos para o substrato, altura em que estes já se encontravam em franco crescimento (Fig. 2.6B) (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 Resultados da transferência directa de rebentos *in vitro* para o substrato, após a sua imersão numa solução com AIB ou apenas em água (controlo). Os valores referem-se à percentagem \pm o desvio padrão dos rebentos estabelecidos após um período de 6 semanas. Os valores seguidos de letra diferente, na mesma linha ou coluna, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Grupos de rebentos	Controlo	AIB (10 mg/l)
Rebentos com caule fino e folhas pouco endurecidas (rcf)	45,8% \pm 38,3 a (54 rebentos)	63,2% \pm 37,2 a (55 rebentos)
Rebentos com caule grosso e folhas endurecidas (rcg)	76,1% \pm 20,8 b (60 rebentos)	88,6% \pm 15,5 b (56 rebentos)

Pelos resultados da Tabela 2.7 depreende-se que a percentagem de rebentos estabelecidos foi bastante elevada, principalmente quando foram utilizados rebentos de caule grosso e folhas endurecidas (76,1 a 88,6%). Em termos estatísticos, este grupo de rebentos forneceu sempre resultados significativamente diferentes do outro grupo de rebentos, tanto em presença de AIB como no controlo. Para cada um dos tipos de rebentos, não foram encontradas diferenças significativas entre a percentagem de estabelecimento

dos rebentos controlo e dos rebentos que foram imersos na solução com AIB. Portanto, neste ensaio, as características dos rebentos tiveram uma grande influência na resposta à aclimatização. Estes resultados quantitativos comprovam as observações verificadas nos ensaios. Durante o período de aclimatização, enquanto quase todas as folhas dos rebentos de caule fino murcharam, grande parte das folhas dos rebentos de caule mais grosso mantiveram-se saudáveis e promoveram assim uma melhor taxa de sobrevivência destes rebentos.

Em termos morfológicos, não se observaram diferenças entre os rebentos sujeitos à auxina e os rebentos controlo. No entanto, quando vistos em grupo, verificou-se que as plantas provenientes dos rebentos que foram sujeitos à acção da auxina eram ligeiramente mais altas que as plantas controlo (Fig. 2.6C). Quinze semanas após a transferência para o substrato as plantas mais altas atingiam já cerca de 30 cm de altura (Fig. 2.6C).

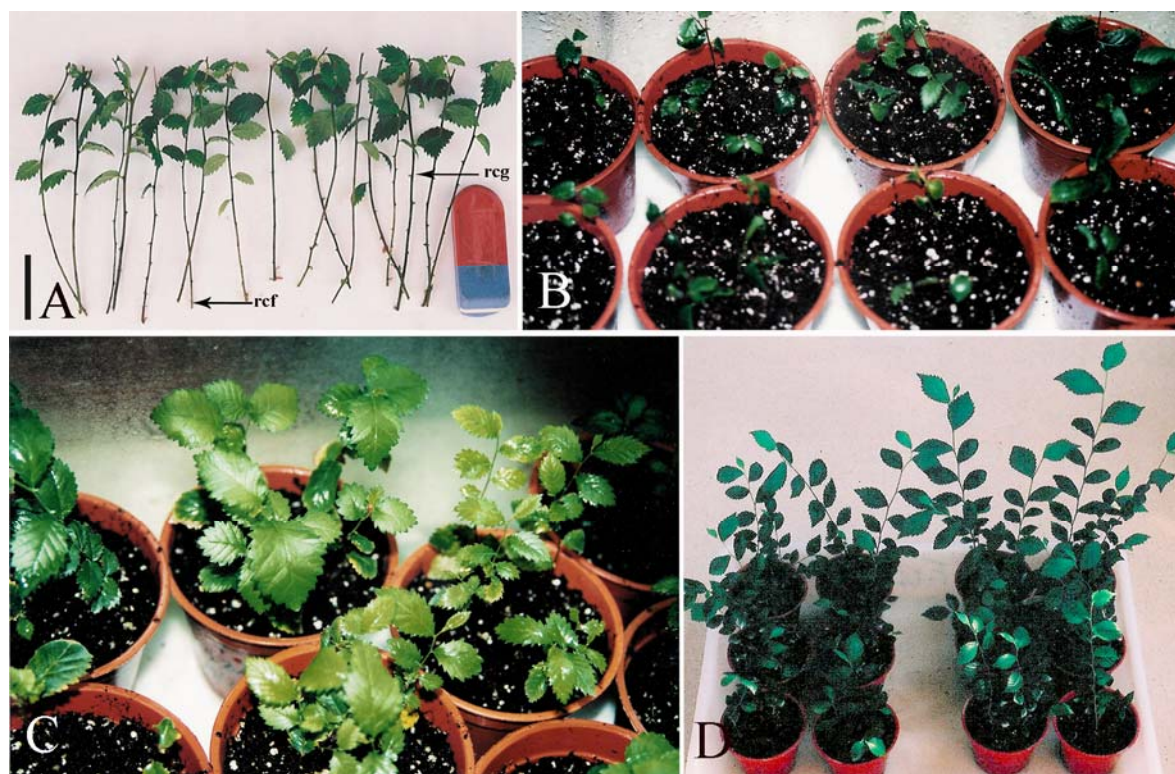


Figura 2.6 Aclimatização directa de rebentos. (A) Tipo de rebentos utilizados: rcf - rebentos de caule fino e folhas pouco endurecidas; reg - rebentos de caule grosso e folhas endurecidas (a barra vale 2,5 cm). (B) Rebentos após colocação em vaso. (C) Rebentos em crescimento, 6 semanas após a transferência para o substrato. (D) Comparação entre as plantas controlo (à esquerda) e as plantas aclimatizadas em presença de AIB (os vasos têm 10 cm de diâmetro, na zona mais larga).

2.3.3.3 Transferência das plantas para o campo

Depois de terem sido mantidas em vaso, durante 18 meses, parte das plantas obtidas através das duas vias de aclimatização, acima citadas, foram transferidas para o campo.



Figura 2.7 Ulmeiros em campo. (A) e (B) Ulmeiros plantados num terreno da responsabilidade da Delegação Regional de Agricultura da Beira Litoral, situado em Calde, Viseu. Os ulmeiros foram plantados em Março de 1999 e esta observação foi registada na Primavera do ano seguinte.

Um grupo formado por 30 plantas foi plantado num terreno da responsabilidade da Delegação Regional de Agricultura da Beira Litoral, situado na Freguesia de Calde, no Concelho de Viseu. A plantação deste terreno estava incluída num projecto de reflorestação com o género *Pinus* que estava a ser desenvolvido naquele concelho. Na Primavera do ano seguinte, todas as árvores estavam estabelecidas (Fig. 2.7 A e B), obtendo-se uma percentagem de 100% de sobrevivência no terreno.

2.4 Discussão e Conclusão

2.4.1 Produção de rebentos a partir de segmentos distais e basais

Nesta secção foram ensaiados dois meios para a proliferação de rebentos de *U. minor*. Estes meios foram anteriormente usados na proliferação *in vitro* de outras espécies de ulmeiro. O meio aqui designado por D2 foi usado por Dorion et al. (1987) na micropropagação de *U. campestris* (um sinónimo de *U. minor*, Navarro e Castroviejo 1993) e de outras espécies e híbridos de *Ulmus*. O meio DKW1 foi usado por Fenning et al. (1993) na micropropagação de um clone do ulmeiro Inglês, *U. procera*.

O meio D2 mostrou-se pouco eficiente. Os resultados aqui descritos para o meio D2 coincidiram, largamente, com os obtidos pelos autores deste meio (Dorion et al. 1987). Este meio foi usado com o propósito de multiplicar os rebentos depois do seu enraizamento prévio. Os resultados apresentados confirmaram este objectivo, uma vez que, a formação de raízes foi observada em 53,7% dos segmentos distais (Gráfico 2.2), sendo este valor muito próximo da percentagem de alongamento obtida para este tipo de explante, 44,8% (Gráfico 2.1). Assim como na publicação original deste meio de cultura, também neste trabalho a proliferação de rebentos só foi possível após a eliminação da dominância apical dos rebentos. Em relação ao uso de segmentos basais, os autores referiram que os genótipos menos reactivos à cultura *in vitro* não apresentaram crescimento dos gomos axilares, o que coincide com o fraco resultado também observado com os indivíduos aqui testados, em que apenas 0,2 rebentos foram formados, em média, por cada explante deste tipo (Tabela 2.3).

Fenning et al. (1993) utilizaram o meio aqui identificado como DKW1 num clone designado SR4 de *U. procera*. Estes autores não referiram os resultados de multiplicação logo após a introdução dos explantes primários mas indicaram que, nove meses depois da introdução *in vitro*, o número médio de rebentos produzidos era de $4,4 \pm 0,39$. Com o genótipo F14 de *U. minor*, utilizado neste trabalho, não foram obtidos resultados tão elevados, mesmo após a manutenção dos rebentos em cultura durante três anos. No final deste período, o número de rebentos formados, em média, foi de $3,06 \pm 0,16$ rebentos. No entanto, a justificação para esta discrepância de resultados deve-se ao facto de aqueles autores terem incluído na quantificação os rebentos produzidos no calo basal dos explantes que, neste ensaio, foram desprezados pela razão que a seguir será apresentada.

O factor rejuvenescimento parece ter exercido, em *U. minor*, a sua influência dado que o número médio de rebentos, aos três anos, foi significativamente superior ao obtido na cultura inicial ($3,06 \pm 0,16$ versus $1,67 \pm 0,94$). De igual forma, a frequência de produção de rebentos também sofreu um incremento, uma vez que $99,4\% \pm 0,56\%$ destes explantes produziram novos rebentos contra $85,6\% \pm 5,14\%$ das culturas iniciais, sendo estes valores percentuais estatisticamente diferentes. Resta ainda salientar que a quantificação aqui realizada só envolveu os rebentos com uma altura mínima de 2 cm, que foi o tamanho determinado suficiente para a subcultura, tendo sido excluídos todos os outros rebentos de menor altura.

Embora os dois meios aqui testados possuíssem uma composição muito diferente, provavelmente as diferenças de resposta encontradas foram devidas, na sua maioria, à presença de citocinina no meio DKW1. Os autores de D2 também testaram a adição de citocinina ao meio mas encontraram uma elevada produção de calo, tanto na introdução dos explantes primários como na multiplicação destes, e desistiram posteriormente da sua utilização. A formação de calo na base dos explantes foi também obtida com DKW1 pelos autores deste meio (Fenning et al. 1993), e, de igual forma, nos ensaios aqui realizados. No entanto, apesar da formação de calo, o tratamento com citocinina levou, simultaneamente, à produção de um grande número de rebentos originados nas gemas axilares do explante principal. Segundo George (1993) esta produção deve-se à remoção da dominância do meristema apical caulinar que é promovida pela citocinina. Neste calo da base deu-se a produção de um grande número de pequenos rebentos, por vezes cerca de vinte (Fig. 2.2H e 2.2I). Embora a maior parte destes tivessem a origem acima descrita, uma pequena parte formava-se no calo. Segundo George (1993) os rebentos regenerados de calo podem diferir geneticamente do explante parental e não é aconselhável associar material com diferentes origens. Por isso, estes rebentos foram apenas utilizados, como material de partida, em experimentações preliminares.

A produção de calo levou a que noutros trabalhos de micropropagação do ulmeiro, em que também foi usada uma citocinina, como o de Fink et al. (1986) (MS + $4,4 \mu\text{M}$ BAP) com *Ulmus* x 'Pioneer' e o de Cheng e Shi (1995) (MS + $1 \mu\text{M}$ BAP) com *U. pumila*, as subculturas fossem realizadas com periodicidade de apenas uma semana. No primeiro caso, em que foi utilizado o meio MS com uma concentração de BAP igual à utilizada neste trabalho ($1 \text{ mg/l BAP} = 4,4 \mu\text{M BAP}$), o número médio de rebentos, obtido

por cada rebento, passou de $1,6 \pm 0,2$ com subcultura às 5 semanas para $3,9 \pm 1,4$ com subcultura semanal. Por outro lado, Cheng e Shi (1995) referiram que, com subcultura semanal, 5,6 rebentos foram formados em meio com 1 μM de BAP, enquanto em meios com 2 a 5 μM de BAP apenas 1 rebento foi obtido, em média, por explante. Este resultado foi apontado pelos autores como sendo devido aos elevados níveis de BAP, que eram promotores da formação de calo que inibia assim a proliferação de rebentos. Tendo em conta estes resultados, poderá pôr-se a hipótese de que a produção de rebentos em *U. minor* também poderá sofrer um incremento se forem realizados ensaios com concentrações de BAP inferiores à testada e se as subculturas forem mais frequentes.

2.4.2 Enraizamento *in vitro* de rebentos

Em relação ao enraizamento, pode dizer-se que o genótipo aqui testado enraizou com alguma facilidade. Dos diferentes meios testados para o enraizamento *in vitro*, o meio DKW3AIB/src forneceu os melhores resultados tendo em conta os vários parâmetros avaliados (frequência de produção de raízes, número de raízes formadas, produção de calo basal, alongamento dos rebentos). Neste meio, 94,7% dos rebentos formaram raízes. No entanto, em qualquer dos cinco meios utilizados a frequência de produção de raízes foi bastante elevada variando entre 80% e 100%.

Fenning et al. (1993) compararam o enraizamento de rebentos provenientes de culturas de *U. procera* mantidas durante cinco meses e um ano no meio de micropropagação (aqui designado DKW1). Desta comparação, os autores concluíram que a frequência de produção de raízes era superior nos rebentos provenientes de culturas com um ano de idade. Com rebentos desta idade, a percentagem de enraizamento foi de 71,0% em meio basal (DKW), contra 83% de enraizamento usando um pulso de 3 mg/l de ANA durante uma semana. Apenas 12,5% dos rebentos de culturas com cinco meses, enraizaram em meio basal. Estes resultados sugerem que apesar de a utilização de auxina promover uma maior percentagem de enraizamento, a sua utilização nestas espécies de *Ulmus* não é indispensável. Recentemente, um outro resultado interessante de enraizamento de *Ulmus* foi publicado. Com *U. glabra*, uma percentagem de enraizamento de 70% foi obtida

usando o meio WPM com 0,4 mg/l de AIB e, neste caso, os autores referiram que maiores concentrações de AIB tinham um efeito depressor (Biroscíková et al. 2004).

Na parte do trabalho de Dorion et al. (1987), direccionada para o enraizamento, os rebentos utilizados também foram mantidos em cultura durante um a dois anos e o factor rejuvenescimento também foi referido como promotor da capacidade de enraizamento.

Assim como nos trabalhos acima citados, também no estudo aqui realizado o factor rejuvenescimento parece ter exercido a sua influência, dado que os rebentos provinham de culturas com um ano e meio de idade. A frequência de produção de raízes aqui obtida em meio basal (DKW) foi ainda superior à obtida por Fenning et al. (1993), para o mesmo meio, com um clone de *U. procera* mantido em cultura durante um ano (80% contra 71%).

Em conclusão, apesar de o meio DKW3AIB/src ter fornecido os melhores resultados, para os vários parâmetros avaliados, o enraizamento em meio basal também se mostrou muito satisfatório. Embora um pouco mais tardia, a formação de raízes neste último meio não necessita de fitoreguladores e torna o processo de enraizamento menos dispendioso.

2.4.3 Aclimatização

Em relação aos ensaios de enraizamento directo de rebentos no substrato, os resultados obtidos sugerem que a utilização de AIB é desnecessária, uma vez que não se verificaram diferenças significativas entre a percentagem de estabelecimento dos rebentos controlo e dos rebentos com AIB. Diferenças significativas foram no entanto encontradas, tanto para o controlo como para o AIB, na comparação dos dois tipos de rebentos que foram utilizados. Os melhores resultados, 88,6% para AIB e 76,1% para o controlo, foram obtidos com os rebentos de caule mais grosso e folhas mais endurecidas (Tabela 2.7). Em conclusão, apesar de a adição de AIB não ser indispensável, a selecção de rebentos de caule mais grosso e folhas mais endurecidas promoveu um melhor estabelecimento dos rebentos no substrato. Este resultado foi devido a dois factores: 1) as folhas mais endurecidas não murcharam porque possuíam uma cutícula mais espessa que lhes permitiu resistir melhor à diminuição da humidade relativa, uma vez que a função primordial desta reside na limitação da perda de água por transpiração (Moreira 1999); 2) os caules mais

grossos, e portanto mais lenhificados, eram mais eficientes no transporte de água e sais minerais e, para além disso, resistiram melhor aos fungos e bactérias a que estão sujeitos durante o processo de aclimatização, evitando assim o apodrecimento.

A percentagem de estabelecimento das plantas com anterior enraizamento *in vitro* foi de 86,4%, estando este valor situado entre os valores obtidos com a utilização de rebentos de caule mais grosso e folhas mais endurecidas da aclimatização directa, 76,1% e 88,6%. Tendo em conta estes valores, pode-se concluir que o enraizamento prévio não teve qualquer relevância, uma vez que a taxa de sobrevivência das plantas não sofreu nenhum incremento. Para além disso, nem mesmo em relação ao período de estabelecimento a utilização de plantas *versus* rebentos mostrou vantagem, dado que em seis semanas o resultado obtido em termos de desenvolvimento foi semelhante. Este resultado poderá ser devido ao facto de as raízes sofrerem danos durante a transferência, embora esta acção tenha sido realizada com muito cuidado. Num trabalho semelhante, realizado com kiwi (*Actinidia deliciosa*), a autora referiu que as raízes formadas *in vitro* morriam devido ao colapso das camadas de células corticais, aquando do envasamento (Barroso 1992). Embora o desenvolvimento das raízes não tenha sido seguido, esta também poderá ser uma explicação para este resultado.

Na maior parte dos trabalhos de micropropagação com o ulmeiro não foi dada grande ênfase a estes ensaios e geralmente os autores referiram apenas que o enraizamento e/ou a aclimatização directa dos rebentos foram realizados com sucesso (Fink et al. 1986; George e Tripepi 1994; Kapaun e Cheng 1997). Apenas Cheng e Shi (1995) testaram o enraizamento directo de rebentos no substrato, com e sem a adição de AIB. Apesar de numa das situações testadas, o substrato ter sido humedecido com uma solução de 8 mg/l de AIB, os autores constataram que não havia diferença no número de raízes produzidas, entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram também encontrados para o genótipo aqui estudado uma vez que a utilização de AIB não promoveu uma maior percentagem de estabelecimento dos rebentos. Desta forma, pode-se então concluir que não há necessidade de se adicionar AIB durante o enraizamento directo, nem mesmo de se proceder a um enraizamento prévio *in vitro*, uma vez que a aclimatização directa de rebentos micropropagados fornece bons resultados e permite assim uma redução do tempo investido e dos custos.

Em conclusão final, os procedimentos aqui apresentados comprovam que é possível micropropagar, com grande sucesso, material proveniente de árvores adultas da espécie *U. minor*. Uma vez que a etapa de enraizamento prévio, *in vitro*, se mostrou desnecessária, pode-se dizer que o processo de micropropagação e de obtenção de plantas envasadas é dividido em duas únicas etapas que são: 1) a introdução dos explantes no meio DKW1, com a consecutiva indução e proliferação de rebentos; e 2) o enraizamento/aclimatização directa dos rebentos no substrato. Estes procedimentos são simples e de fácil execução e poderão ser facilmente testados em outros genótipos desta espécie ou em outras espécies do género *Ulmus*.

Referências bibliográficas

- Barroso MM (1992)** *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* (kiwi): condições de cultura *in vitro* e bases para a transformação genética. Tese de Doutoramento da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
- Ben Jouira H, Hassairi A, Bigot C, Dorion N (1998)** Adventitious shoot production from strips of stem in the Dutch elm hybrid ‘Commelin’: plantlet regeneration and neomycin sensitivity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 153-160
- Biroscíková M, Spisáková K, Lipták S, Pichler V, Durkovic J (2004)** Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds.). *Plant Cell Reports* 22: 640-644
- Bolyard MG, Hajela RK, Sticklen MB (1991^a)** Microprojectile and Agrobacterium-mediated transformation of ‘Pioneer’ elm. *Journal of Arboriculture* 17: 34-37
- Cheng Z, Shi N (1995)** Micropropagation of mature Siberian elm in two steps. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41: 197-199
- Dorion N, Godin B, Bigot C (1993)** Physiological state and clonal variability effects on low temperature storage of *in vitro* shoot cultures of elms (*Ulmus* sp.). *Scientia Horticulturae* 56: 51-59
- Dorion N, Hassairi A, Guyon P, Godin B, Bigot C (1995)** *In vitro* budding ability of woody internode and *Agrobacterium* susceptibility as prerequisites for elm genetic transformation. *Journal of Plant Physiology* 146: 699-703
- Dorion N, Danthu P, Bigot C (1987)** Multiplication végétative *in vitro* de quelques espèces d’ormes. *Ann. Sci. For.* 44: 103-118

- Driver JA, Kuniyuki AH (1984)** In vitro propagation of paradox walnut rootstock. HortScience 19: 507-509
- Durzan DJ, Lopushanski SM (1975)** Propagation of American elm via cell suspension cultures. Canadian Journal of Forestry Research 5: 273-277
- Dytham C (1999)** Choosing and Using Statistics, A Biologist's Guide. Blackwell Science Ltd, Oxford, 215 pp
- Fenning TM, Gartland KMA, Brasier CM (1993)** Micropropagation and regeneration of english elm, *Ulmus procera* Salisbury. Journal of Experimental Botany 44: 1211-1217
- Fenning TM, Tymens SS, Gartland JS, Brasier CM, Gartland KMA (1996)** Transformation and regeneration of English elm using wild-type *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science 116: 37-46
- Fink CVM, Sticklen MB, Lineberger RD, Domir SC (1986)** In vitro organogenesis from shoot tip, internode, and leaf explants of *Ulmus* x 'Pioneer'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7: 237-245
- Gartland JS, Brasier CM, Fenning TM, Birch R, Gartland KMA (2001)** Ri-plasmid mediated transformation and regeneration of *Ulmus procera* (English elm). Plant Growth Regulation 33: 123-129
- Gartland JS, McHugh AT, Brasier CM, Irvine RJ, Fenning TM, Gartland KMA (2000)** Regeneration of phenotypically normal English elm (*Ulmus procera*) plantlets following transformation with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. Tree Physiology 20: 901-907
- Gartland KMA, McHugh AT, Crow RM, Garg A, Gartland JS (2005)** 2004 SIVB congress symposium proceeding: biotechnological progress in dealing with Dutch elm disease. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant 41: 364-367
- George EF (1993)** Plant growth regulators. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd., pp. 420-476
- George MW, Tripepi RR (1994)** Cytokinins, donor plants and time in culture affect shoot regenerative capacity of American elm leaves. Plant Cell Tissue and Organ Culture 39: 27-36
- GM trees fight DED (2001)** BBC News. Acedido em 2/9/2001 em: <http://news.bbc.co.uk/1/hi/scotland/1512210.stm>
- Harvengt L, Dumas E, Meier-Dinkel A, Collin E (2004)** Establishment of a cryopreserved gene bank of European Elms. Canadian Journal of Forestry Research 34: 43-55
- Heller R (1953)** Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux, cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Paris 14: 1-223
- Kapaun JA, Cheng Z (1997)** Plant regeneration from leaf tissues of siberian elm. HortScience 32: 301-303

- Karnosky DF, Podila GK (1993)** Elm improvement via biotechnological methods. In: Sticklen MB Sherald JL (ed.s) Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. Springer-Verlag, New York, pp. 75-80
- Moreira I (1999)** Histologia Vegetal (3ª ed.). Didáctica Editora, Lisboa, 294 pp
- Morel G, Wetmore RH (1951)** Fern callus tissue culture. American Journal of Botany 38: 141-143
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Navarro C, Castroviejo S (1993)** LXI Ulmaceae. In: Castroviejo S Aedo C Cirujano S Laínz M Montserrat P Morales R Muñoz Garmendia F Navarro C Paiva J Soriano C (eds.) Flora Ibérica, Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Real Jardín Botánico, Madrid, pp. 244-250
- Sticklen MB, Hajela RK, Bolyard MG, Graham LS, Sherald JL (1994)** Genetic transformation in *Ulmus* species (elms). In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 29, Plant Protoplasts and Genetic Engineering V. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 401-410

Capítulo 3

Regeneração de rebentos por organogénese em calo e folhas de *Ulmus minor* Mill.

Parte do trabalho deste capítulo foi submetido para publicação em:

Conde P, Santos C. (2007) Plant regeneration by indirect and direct organogenesis in *Ulmus minor* Mill. leaves (submetido a Plant Cell Tissue and Organ Culture)

3 Regeneração de rebentos por organogénese em calo e folhas de *Ulmus minor* Mill.

Sumário

O objectivo neste capítulo foi promover a regeneração de rebentos por organogénese directa em folhas e por organogénese indirecta em calo produzido a partir de folhas de ramos dormentes de um ulmeiro adulto.

Numa primeira etapa foram ensaiados cinco meios de cultura para a produção de calo de *U. minor*, previamente utilizados com esta finalidade em espécies ou híbridos do género *Ulmus*. Nestes meios foram usadas diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento. O meio MS3 foi o que mostrou melhores resultados, em relação aos parâmetros avaliados, e foi o utilizado em todos os ensaios subsequentes. Usando o calo produzido neste meio, a regeneração de plantas foi ensaiada transferindo o calo para meios com diferentes concentrações de duas citocininas. As citocininas utilizadas foram Kn e BAP mas, só a segunda mostrou resultados positivos. Na presença desta, 91,1% dos calos formaram rebentos quando transferidos para meio base de DKW com 1 mg/l de BAP. Entre os rebentos formados nos calos, 29,4% mostraram alongamento espontâneo, após a realização de subculturas frequentes, com uma produção média de $1,86 \pm 0,21$ rebentos por explante com esta resposta. Estes rebentos foram enraizados dando origem a plantas normais que foram posteriormente aclimatizadas. Os explantes com rebentos que não alongaram foram subcultivados para um meio com menor concentração de citocinina e para outro sem citocinina, mas, em nenhum deles o alongamento foi promovido. Este objectivo foi conseguido após a utilização de um meio com carvão activado tendo-se obtido o alongamento de rebentos em 49,4% dos explantes mas, estes possuíam anormal morfologia.

Numa segunda etapa deste capítulo, foi tentada a regeneração de rebentos por organogénese directa em folhas. Este objectivo foi atingido, mas, em paralelo com a regeneração directa foram também obtidos rebentos por organogénese indirecta, tornando esta via de regeneração incerta. Apesar disso, este processo de micropropagação permitiu a

obtenção de um elevado número de rebentos com uma percentagem de regeneração que atingiu os 43,1%.

3.1 Introdução

A organogénese de rebentos é uma das formas de produção de plantas *in vitro*, que tem sido largamente usada na biotecnologia vegetal visando a micropropagação e a transformação genética (Zhang e Lemaux 2004). A organogénese de rebentos pode ser obtida por via directa e por via indirecta. Segundo George (1993), na organogénese directa os rebentos adventícios surgem directamente nos tecidos, enquanto na organogénese indirecta os rebentos surgem em calo pré-formado. Ao nível da cultura *in vitro* do ulmeiro, vários trabalhos foram publicados usando esta via de micropropagação tendo como objectivo final o estabelecimento de um eficiente sistema de regeneração de rebentos, aplicável à produção de plantas transformadas. Nesses trabalhos, os explantes usados com maior frequência foram folhas de plantas micropropagadas e folhas de plantas mantidas em estufa. Os reguladores de crescimento, ou seus substitutos, mais usados nestes estudos foram BAP e TDZ, em concentrações muito variáveis. Publicações deste tipo foram realizadas com o híbrido ‘Pioneer’ (Fink et al. 1986), com o ulmeiro Inglês (*U. procera*) (Fenning et al. 1993), com o ulmeiro Americano (*U. americana*) e o ulmeiro Chinês (*U. parvifolia*) (Bolyard et al. 1991; George e Tripepi 1994), com o ulmeiro Siberiano (*U. pumila*) (Kapaun e Cheng 1997) e com o híbrido Holandês ‘Commelin’ (Ben Jouira et al. 2000). Na maior parte dos estudos, acima citados, a via de obtenção de rebentos foi descrita com sendo do tipo directo, embora alguns autores tivessem referido que as duas formas de organogénese ocorreram em simultâneo (Fink et al. 1986). No entanto, existem também estudos com o ulmeiro que demonstraram a obtenção de rebentos por organogénese indirecta, após a produção de calo. Curiosamente, os primeiros estudos de regeneração do ulmeiro foram efectuados usando esta via de micropropagação uma vez que, inicialmente, não foi possível regenerar o ulmeiro Americano utilizando material de árvores maduras (Domir et al. 1993). Estes estudos foram realizados utilizando calos formados em tecidos jovens, como hipocótilos e cotilédones (Durzan e Lopushanski 1975; Karnosky et al. 1982). Posteriormente, devido à incompatibilidade sexual verificada entre

o ulmeiro Americano e as outras espécies Europeias e Asiáticas, culturas de calo de diversas origens foram usadas no isolamento de protoplastos e, depois, na regeneração indirecta de rebentos a partir do calo derivado dos protoplastos (Sticklen et al. 1986), sendo o objectivo final de todo este processo a obtenção de híbridos somáticos (Domir et al. 1993). A cultura de calos foi também utilizada com o objectivo de abreviar o período necessário à obtenção dos resultados de sujeição das árvores ao fungo da grafiose, dos programas de cruzamento. Por isso, começaram a ser efectuados trabalhos em que culturas de calo de ulmeiro foram sujeitas a filtrados de cultura do fungo (Pijut et al. 1990). Estes trabalhos visaram outros propósitos, para além da selecção de linhas de calo que se mostrassem tolerantes, entre os quais o estudo das melhores condições de crescimento do calo e a comparação das respostas de génotipos tolerantes e susceptíveis e de isolados agressivos e não agressivos do fungo (Pijut et al. 1990; Domir et al. 1991; Domir et al. 1992; Schreiber e Domir 1994). Os calos foram ainda utilizados no estudo da actividade de enzimas envolvidas na resposta a agente patogénicos, usando culturas de células em suspensão (Corchete et al. 1993; Valle et al. 1997). Mais recentemente, este tipo de cultura foi realizada com clones do ulmeiro Americano, de diferente susceptibilidade ao fungo, com o objectivo de encontrar diferenças nos parâmetros de crescimento das várias linhas de células cultivadas (Eshita et al. 2000). De uma forma geral, o meio de cultura mais utilizado em todos estes estudos foi o meio de Murashige e Skoog (1962) mas, a combinação de reguladores de crescimento utilizada variou muito entre os grupos de investigação que utilizaram culturas de calo.

O objectivo deste capítulo foi regenerar rebentos via organogénese directa e indirecta. Para a regeneração indirecta houve necessidade de promover uma eficaz produção de calo a partir de folha que, posteriormente, foi transferido para vários meios com citocinina para determinar o seu potencial organogénico. O calo assim obtido foi ainda usado como fonte de material para o isolamento de protoplastos, no capítulo seguinte (Cap. 4). Para a regeneração via organogénese indirecta, foram usadas folhas de material de campo e também folhas de rebentos micropropagados.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Regeneração de rebentos por organogênese indirecta

3.2.1.1 Produção de calo a partir de folhas

Nesta secção o objectivo foi promover a produção de calo em explantes de folha. Os meios utilizados tiveram como base diferentes meios de cultura utilizados, com sucesso, na produção de calo de outras espécies do género *Ulmus* (Tabela 3.1). Estes meios foram designados por siglas práticas necessárias para a sua identificação e a constituição de cada um, junto com a sua referência, são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Descrição da composição dos meios de cultura empregues na produção de calo a partir de folhas

	MS1 (Corchete et al. 1993) <i>U. pumila</i> <i>U. campestris</i>	MS2 (Fink et al. 1986) <i>U. x Pioneer</i>	MS3 (Sticklen et al. 1986) <i>U. x Pioneer</i>	D1 (Dorion et al. 1987) <i>U. campestris</i> macro MS + micro de Heller (1953)	B5 (Duchesne et al. 1994) <i>U. carpinifolia</i> <i>U. x Pioneer</i> B5 (Gamborg et al. 1968)
Composição salina	MS	MS	MS		
Composição orgânica	MS + 200mg/l caseína hidrolisada	MS + 200mg/l caseína hidrolisada	MS + 200mg/l caseína hidrolisada	Vit. de Morel e Wetmore (1951)	B5 (Gamborg et al. 1968)
Reguladores crescimento	0,45 µM 2,4-D 9,0 µM BAP	5,0 µM BAP	2,5 µM 2,4-D 1,0 µM Kn	2,5 µM AIB 2,2 µM BAP	0,45 µM 2,4-D 9,0 µM BAP
Sacarose	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Agar	7 g/l	7 g/l	7 g/l	7 g/l	7 g/l
pH	5,7	5,7	5,7	5,5	5,7

* combinação de reguladores de crescimento do meio MS1

As folhas utilizadas foram excisadas de rebentos abrolhados em ramos dormentes, cuja base foi mergulhada em água (material descrito no capítulo anterior). Apenas foram utilizadas as três folhas mais jovens que se encontravam completamente expandidas. Estas

folhas foram desinfectadas superficialmente, por imersão em etanol a 70% (v/v) durante 30 segundos e em lixívia comercial Neoblanc® a 20% (v/v) durante 15 minutos. Após este procedimento, as folhas foram três vezes lavadas em água destilada, estéril e fria. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, a margem das folhas foi retirada e a zona central dos explantes foi ligeiramente ferida.

Os explantes foram cultivados em placas de petri de vidro de 9 cm de diâmetro e cada conjunto de 6 explantes, colocado por placa, funcionou como uma réplica individual. Neste método foram executados dois ensaios independentes, com 8 réplicas por meio, perfazendo um total de 48 explantes para cada meio. As placas foram colocadas em condições de luminosidade com um fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. As subculturas foram realizadas aos 21 dias.

Para a determinação do peso fresco, o conjunto dos 6 explantes de cada réplica foi pesado antes da cultura e aos 3, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a cultura. Em simultâneo com o registo do peso fresco, foram registadas as alterações qualitativas observadas em cada um dos meios testados, ao longo do tempo.

3.2.1.2 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta a partir de calo

Em ensaios preliminares, o calo produzido em MS3 (Tabela 3.1) foi transferido para meios com várias concentrações de BAP e Kn que tinham como base o meio MS. No entanto, devido à elevada fenolização que foi observada, e à posterior necrose do tecido, este procedimento teve que ser alterado. Optou-se então pela transferência do calo produzido em MS3 para meios com a composição salina de DKW.

Calo mantido durante seis meses no meio $\frac{1}{2}$ MS3, foi transferido para meios com a composição salina de DKW cada um deles com 0,5, 1, 2, e 4 mg/l de BAP em caixas de petri de 9 cm de diâmetro. Dez fragmentos de calo foram transferidos para cada caixa de petri, que funcionava como réplica. As placas foram colocadas em condições de luminosidade em câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas, a uma intensidade luminosa de 62 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e a uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Todo o procedimento foi realizado duas vezes.

Até se observar a produção de grânulos de tecido verde, as subculturas foram realizadas às quatro semanas e, após esta produção, foram realizadas de duas em duas semanas. Após o alongamento dos primeiros rebentos, os explantes com estes foram mudados para frascos com o mesmo meio, durante duas semanas, e, após este período, foram transferidos para frascos com meio de enraizamento DKW3AIB/src (Cap. 2).

Os restantes explantes com minúsculos rebentos, que não mostravam alongamento, foram divididos e transferidos para frascos com os meios descritos na Tabela 3.2, numa tentativa de promover o seu alongamento.

Tabela 3.2 Descrição da composição dos meios testados no alongamento de rebentos adventícios de ulmeiro

	DKW1BAP	DKW0,25BAP	DKWsrc
Reguladores de crescimento	1 mg/l BAP (4,4 µM)	0,25 mg/l BAP (1,1 µM)	sem reguladores de crescimento
Composição	DKW (1) + 30 g/l sacarose + 7 g/l agar, pH 5,7		

(1) Driver e Kuniyuki (1984); src – sem reguladores de crescimento

Num ensaio posterior, os explantes com minúsculos rebentos foram colocados, durante um mês, em DKW src ao qual foi adicionado carvão activado na concentração de 0,5% (p/v). Passado esse período, os explantes foram retirados desse meio e transferidos para DKWsrc sem carvão activado.

3.2.2 Regeneração de rebentos por organogénese em folhas

Folhas de rebentos produzidos por abrolhamento de ramos de Inverno (material descrito no capítulo anterior) foram utilizadas como fonte de material para a produção de rebentos em assepsia. Estas folhas foram desinfectadas superficialmente como acima descrito. Os meios utilizados foram meios anteriormente empregues na regeneração de rebentos a partir de folhas de outras espécies de ulmeiro (Tabela 3.3). As folhas foram colocadas inteiras, em grupos de 5 a 6, em caixas de petri de 9 cm de diâmetro. Em dois

ensaios repetidos foram cultivadas 33 folhas no meio DKW1BAP, 53 folhas no meio DKW2 e 40 folhas no meio MS5.

Tabela 3.3 Descrição da composição dos meios de cultura DKW1BAP, DKW2 e MS5 utilizados na regeneração de rebentos a partir de folhas de ulmeiro

	DKW1BAP (Fenning et al. 1993) <i>U. procera</i>	DKW2 (George e Tripepi 1994) <i>U. americana</i>	MS5 (Bolyard et al. 1991 ^b) <i>U. americana</i> <i>U. parvifolia</i>
Composição salina	DKW	DKW	MS
Composição orgânica	DKW	DKW	Tiamina-HCl 2 mg/l; Mio-inositol 100 mg/l
Reguladores de crescimento	4,4 µM BAP (1 mg/l BAP)	15 µM TDZ (3,3 mg/l)	0,1 µM TDZ (0,02 mg/l)
Sacarose	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Agar	7 g/l	7 g/l	7 g/l
pH	5,7	5,7	5,6

MS – Murashige e Skoog (1962); DKW - Driver e Kuniyuki (1984).

Num outro ensaio, a regeneração foi testada em folhas dos rebentos micropropagados no meio DKW1, tendo estas sido colocadas no meio DKW1BAP. Nesta segunda abordagem, as folhas foram cultivadas em duas condições que eram a execução, ou não, de cortes perpendiculares à nervura central. Desta forma, foram realizados dois ensaios num total de 37 réplicas para cada condição. Cada réplica consistia numa caixa de petri de 9 cm de diâmetro com 5 a 6 folhas, tendo sido cultivadas 202 folhas cortadas e 212 não cortadas. As folhas foram cultivadas com a face abaxial em contacto com o meio, imediatamente a seguir à excisão dos rebentos, tendo o cuidado de eliminar o gomo axilar. Foram apenas utilizadas as três folhas, mais próximas do ápice caulinar, que se encontravam totalmente expandidas. As placas foram cultivadas em câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas, a uma intensidade luminosa de 62 µmol/m²/s e a uma temperatura de 24 ± 2°C. As subculturas foram realizadas, 6 semanas após a cultura inicial, para frascos de 200 ml de capacidade com meio DKW1.

3.2.3 Análise estatística

A significância da diferença entre as médias foi analisada pela distribuição t-Student, para $P \leq 0,05$. Antes da aplicação do teste t foi verificada a diferença entre as variâncias empregando o teste de Fisher (teste F) e, quando estas eram significativamente diferentes, foi realizado um teste t aproximado (Dytham 1999). Todos os cálculos foram efectuados usando o programa Microsoft® Excel X for Mac®.

3.3 Resultados

3.3.1 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta

3.3.1.1 Produção de calo a partir de folhas

A resposta dos explantes de folha aos meios de produção de calo apresentou grande variabilidade, como se pode observar pela variação do peso fresco apresentada no Gráfico 3.1. O peso inicial dos explantes não foi significativamente diferente, logo as diferenças do peso médio observadas não foram devidas a este factor ($P \leq 0,05$). No decorrer dos ensaios, verificou-se que o peso médio dos explantes aumentou sempre ao longo do tempo, em todos os meios. Porém, o peso médio dos explantes cultivados nos meios D1 e MS2 foi bastante inferior ao dos outros meios. Estes dois meios apresentaram uma variação relativamente pequena entre as réplicas e possuíam, por isso, pequenos desvios em relação à média. Os meios MS1 e MS3 destacaram-se devido à apresentação de pesos frescos muito elevados. O meio MS3 apresentou, no início dos ensaios, valores do peso fresco relativamente baixos que subiram depois, particularmente, após os 14 dias em cultura, sendo no final dos ensaios o meio com os valores médios de peso fresco mais elevados. No entanto, este apresentou desvios muito acentuados em relação à média que se deveram à heterogeneidade de resposta de réplicas individuais. O meio MS1 apresentou desvios menores que os do meio MS3 mas o valor do peso médio das réplicas foi bastante inferior ao registado para MS3. O meio B5 ocupou uma posição intermédia entre os dois grupos de meios, acima descritos, e, em relação aos desvios, estes foram semelhantes aos observados

para o meio MS1. Tendo em conta o peso fresco, no final dos 21 dias, verificou-se que os resultados obtidos nos meios D1 e MS2 não diferiam significativamente entre si mas que eram significativamente inferiores aos obtidos em MS1 e MS3 ($P \leq 0,05$). Desta mesma análise, também se concluiu que as médias de peso fresco obtidas para MS1 e MS3 também não eram significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$).

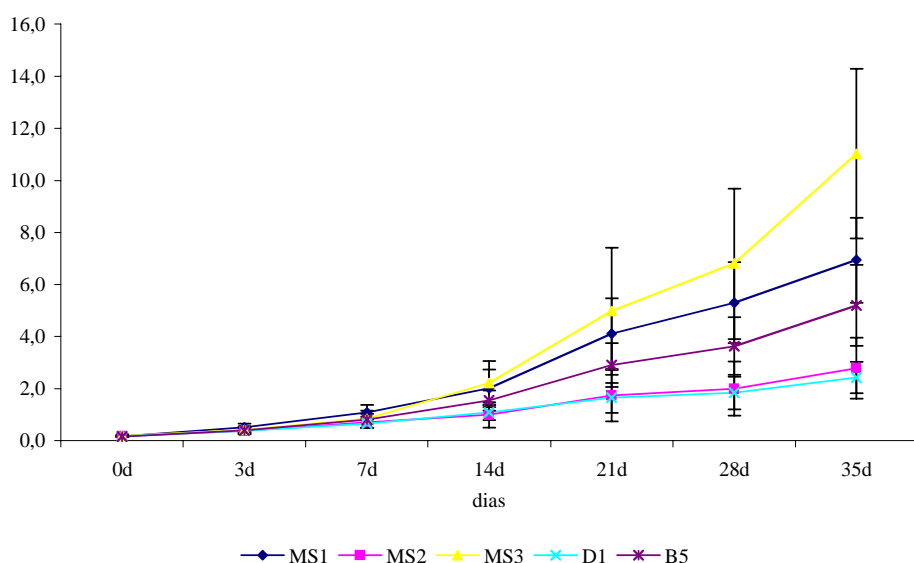


Gráfico 3.1 Médias do peso fresco dos explantes de folha cultivados nos meios MS1, MS2, MS3, D1 e B5 para produção de calo a partir de folhas. O peso fresco de cada réplica foi registado inicialmente aos três dias e depois semanalmente até aos 35 dias. Os valores apresentados dizem respeito à média de 8 réplicas de dois ensaios independentes, tendo cada réplica 6 explantes.

Em termos qualitativos, verificou-se que o meios D1 e MS2 apresentaram uma desdiferenciação muito reduzida, que se limitava quase exclusivamente à extremidade dos explantes e às zonas de corte (Fig.s 3.1D e 3.1E). O calo formado nestes meios, em diminuta quantidade, era pouco friável e pouco proliferativo. Estas observações estavam de acordo com os baixos pesos médios obtidos nestes meios. O meio B5 apresentou uma pequena produção de calo friável e proliferativo que ficou castanho muito rapidamente (Fig. 3.1F). Finalmente, os explantes cultivados nos meios MS1 e MS3 evidenciaram uma extensa desdiferenciação com a consequente produção de um calo friável e proliferativo que estava de acordo com a evolução dos pesos médios. Porém, o calo produzido no meio MS3 (Fig. 3.1B) apresentava um aspecto mais friável e menor acastanhamento que o calo obtido no meio MS1 (Fig. 3.1C).

Aos 28 dias em cultura, uma semana após a primeira subcultura, verificou-se em todos os meios uma ligeira diminuição do peso fresco (Gráfico 3.1). Porém, o meio MS3 mostrou posteriormente uma rápida recuperação e proliferação de calo que não foi acompanhada por nenhum dos outros meios, nem mesmo pelo meio MS1.

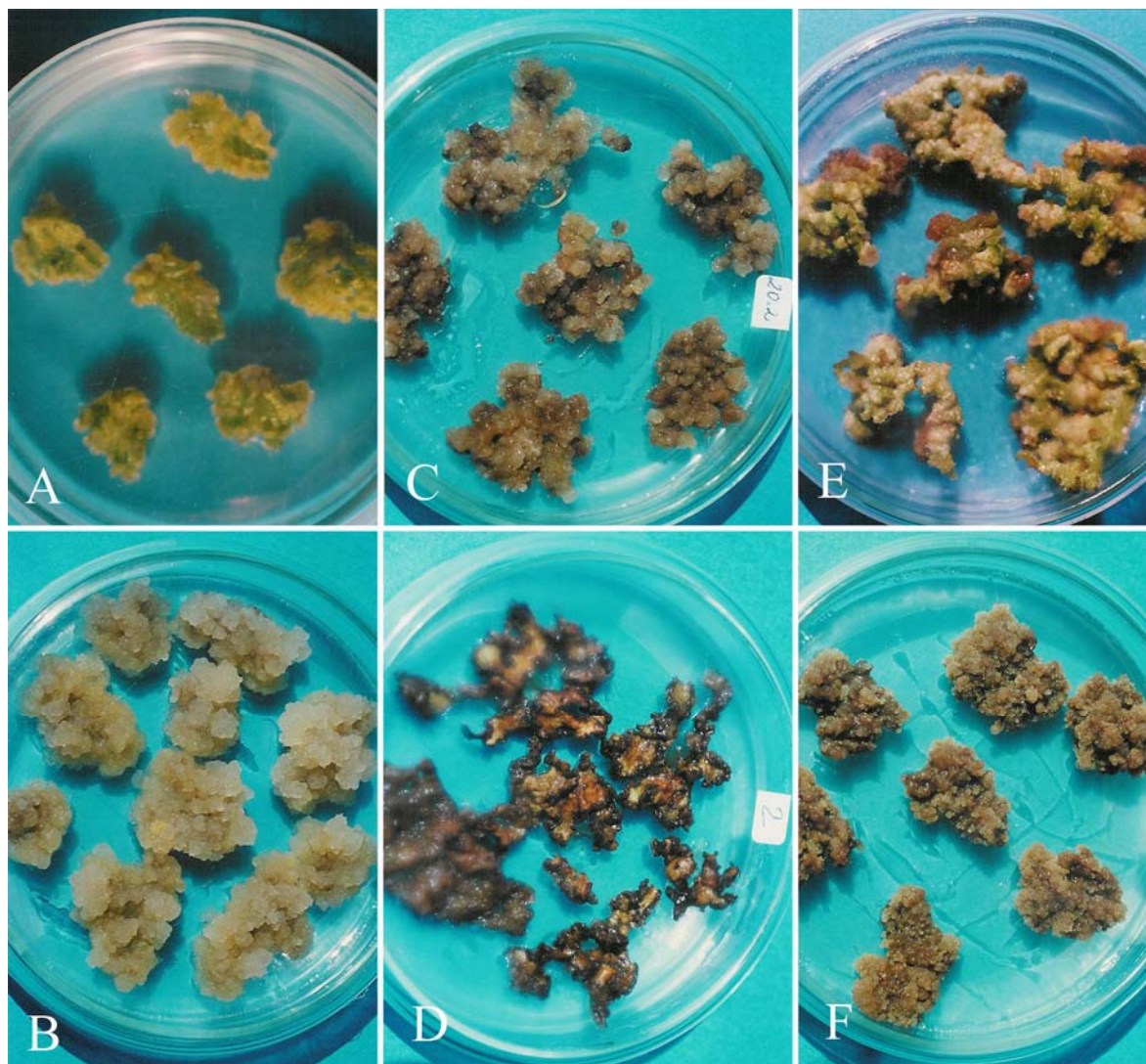


Figura 3.1 Produção de calo a partir de folhas de ulmeiro. (A) Explantes de folha após sete dias em cultura no meio MS3. B – F Produção de calo nos diferentes meios após 35 dias em cultura. (B) MS3. (C) MS1. (D) D1. (E) MS2. (F) B5; (as caixas de petri possuem 90 mm de diâmetro).

Tendo em conta os resultados obtidos com os diferentes meios, aquele que se mostrou mais adequado para a produção de calo a partir de folhas de *U. minor* foi o meio MS3 (Fig. 3.1A e 3.1B). Devido à elevada proliferação do calo neste meio, este acastanhava com alguma frequência, num intervalo de tempo relativamente curto. Este problema foi minimizado mantendo o calo em meio de igual constituição mas com a

concentração de sais reduzida para metade da força. Desta forma, a quantidade de calo produzida não era tão elevada e a fenolização do tecido era retardada.

Embora os resultados aqui apresentados se reportem à utilização de folhas provenientes do abrolhamento de ramos de Inverno, o cultivo em MS3 de folhas dos rebentos micropropagados no meio DKW1 mostrou, de igual forma, resultados positivos.

3.3.1.2 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta a partir de calo

O procedimento experimental desta secção foi iniciado com calo produzido em MS3 (Tabela 3.1) que foi transferido para meios, com a formulação salina do MS, com várias concentrações de BAP e Kn (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/l), para comparação dos seus efeitos. Apesar de se ter verificado algum esverdeamento, apenas nos meios com BAP, com o avançar do tempo em cultura os calos fenolizaram acentuadamente, perderam o seu tom verde e a maior parte destes acabou por necrosar. Tendo em conta prévias observações de sobrevivência e esverdeamento do calo, quando cultivado no meio DKW, este protocolo sofreu alterações e o calo produzido em MS3 foi transferido para meios com as concentrações de BAP já definidas, mas que possuíam a composição salina do DKW (Driver e Kuniyuki 1984).

Cerca de três semanas após a transferência dos calos para os quatro meios com BAP, verificou-se que estes se tornavam compactos e começavam a adquirir um tom verde. Os explantes no meio DKW1BAP (DKW com 1 mg/l de BAP) possuíam, nesta altura, grânulos mais verdes que, à lupa, mostravam já meristemas e pequenos rebentos (Fig. 3.2A e 3.2B). Com o avançar da permanência em meio com BAP, a cor verde acentuou-se mas, simultaneamente, começou-se a verificar alguma fenolização dos explantes ao fim de cinco semanas. Nesta altura, 75,3% dos explantes em DKW4BAP mostravam acastanhamento, sendo seguidos pela concentração de DKW2BAP, com 66,7% dos explantes com cor castanha. Em DKW1BAP, 51,2% do material possuía, naquele período, cor castanha, mas, na metade não fenolizada, a cor verde observada era a mais intensa de todos os meios. No meio DKW0,5BAP, a quantidade de explantes fenolizados era muito baixa, atingindo apenas 20,1% dos explantes, mas, apesar de exibirem algum esverdeamento, estes formaram meristemas apenas ocasionalmente. O acastanhamento dos

tecidos foi aumentando progressivamente e este fenómeno foi intensificando com a idade da cultura tendo a maior parte do material, nos dois meios com maior concentração de BAP, sofrido necrose. O esverdeamento dos calos com a consequente formação de meristemas foi apenas mantido em DKW1BAP.

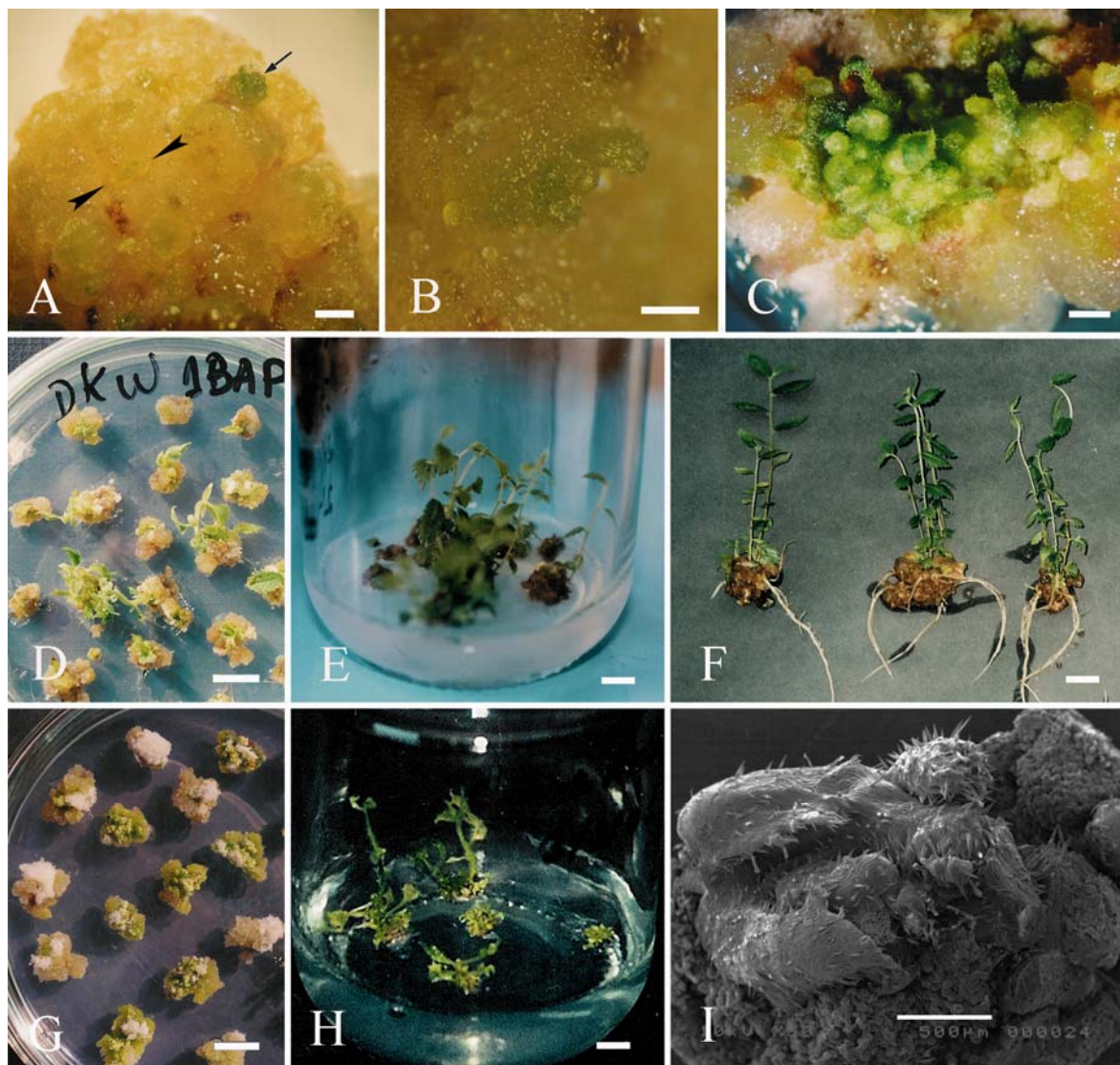


Figura 3.2 Regeneração de rebentos a partir de calo. (A) Meristema apical caulinar (cabeças de seta) e pequeno rebento (seta) observados 3 semanas após a transferência do calo para o meio DKW1BAP (a barra vale 1 mm). (B) Ampliação do meristema apical anterior que se mostra ladeado por dois primórdios foliares (a barra vale 0,25 mm). (C) Grupo de rebentos em DKW1BAP, após dois meses e meio de permanência neste meio (a barra vale 0,9 mm). (D) Rebentos alongados espontaneamente no meio DKW1BAP (a barra vale 8 mm). (E) Rebentos em alongamento em frasco com DKW1BAP (a barra vale 1 cm). (F) Rebentos enraizados após transferência para o meio DKW3AIB/src (a barra vale 1 cm). (G) Desenvolvimento de calo “espumoso” sobre os explantes com rebentos mais velhos no meio DKW1BAP (a barra vale 8 mm). (H) Rebentos alongados após passagem por meio com carvão activado (a barra vale 0,5 cm). (I) Visualização de um explante semelhante ao apresentado em C, por microscopia electrónica de varrimento. Notar a forma comprimida em que os rebentos se encontram.

Dois meses e meio após a subcultura para o meio de regeneração, DKW1BAP, a frequência de produção de pequenos rebentos foi de $91,1\% \pm 9,1$ (148 explantes) (Fig. 3.2C). Nesta fase, o material começou a ser subcultivado quinzenalmente, devido a uma grande proliferação dos minúsculos rebentos. Após quatro meses de subculturas, com esta periodicidade, $29,4\% \pm 17,8$ (152 explantes) dos explantes apresentaram rebentos que alongaram espontaneamente (Fig. 3.2D), mas, esta resposta estagnou rapidamente. A média e o erro padrão do número de rebentos produzidos nos explantes com esta resposta foi de $1,86 \pm 0,21$ rebentos (30 explantes). Os explantes com rebentos em alongamento foram depois transferidos para frascos com o mesmo meio de regeneração, durante duas semanas, para promoção do seu alongamento (Fig. 3.2E). Depois desta fase, os rebentos foram transferidos para o meio de enraizamento DKW3AIB/src (Cap. 2). Após um mês, todos os rebentos enraizaram (Fig. 3.2F). As plantas obtidas foram posteriormente aclimatizadas e, morfologicamente, não mostraram diferenças quando comparadas com as plantas micropropagadas a partir dos segmentos nodais. Estas mostraram características semelhantes em relação à forma e tamanho das folhas e alongamento e espessura do caule.

Tabela 3.4 Resultados da colocação de explantes com calo verde e pequenos rebentos adventícios, nos meios testados para o alongamento dos rebentos

	Alongamento dos rebentos	Proliferação dos rebentos	Proliferação do calo	Cor do calo	Dureza do calo
DKW1BAP	esporádico	sim	sim	verde	muito duro
DKW0,25BAP	esporádico	sim	sim	verde	duro
DKWsrc	inexistente	não	não	amarelo	sem dureza

Numa tentativa de alongar os rebentos que não sofreram alongamento, os explantes foram transferidos para um meio com um quarto da concentração inicial de citocinina (DKW0,25BAP) e para meio sem citocinina (DKWsrc). Os resultados obtidos na transferência para estes meios e, na manutenção dos explantes no mesmo meio de regeneração, estão descritos na Tabela 3.4. Em nenhum destes meios se conseguiu alongar os rebentos de modo eficaz. A manutenção no meio de regeneração levou a que se verificasse uma proliferação contínua dos rebentos, mas, estes alongaram apenas

esporadicamente. Para além disso, com o avançar do tempo de permanência neste meio começou-se a desenvolver tecido do tipo “espumoso” sobre os rebentos mais velhos (Fig. 3.2G). A colocação dos explantes no meio DKW0,25BAP promoveu, de igual modo, apenas o alongamento esporádico de alguns rebentos. Mantendo os explantes no meio sem reguladores de crescimento (DKWsrc), também não se conseguiu atingir aquele objectivo.

Uma última abordagem foi então testada, os explantes com rebentos foram transferidos para meio sem reguladores de crescimento com 0,5% (p/v) de carvão activado e permaneceram neste meio durante quatro semanas. Após este período, os explantes foram novamente transferidos para o mesmo meio, agora desprovido de carvão activado. Nestas condições $49,4\% \pm 27,7$ (67 explantes) dos explantes mostraram rebentos em alongamento (Fig. 3.2H). No entanto, em termos morfológicos, estes rebentos eram diferentes dos formados previamente em DKW1BAP (Fig. 3.2E e 3.2F). Os rebentos alongados após a introdução no meio com carvão activado, apresentavam caules finos e torcidos e folhas muito pequenas e enroladas (Fig. 3.2H).

3.3.2 Regeneração de rebentos por organogénese em folhas

Folhas de material de campo foram cultivadas numa tentativa de obtenção de rebentos em material com esta origem. Para isso, foram testados três meios, previamente utilizados com este fim noutras espécies de ulmeiro a partir do mesmo tipo de explante. O meio DKW1BAP tinha sido utilizado para o ulmeiro Inglês (Fenning et al. 1993), o meio DKW2 (George e Tripepi 1994) tinha sido utilizado para o ulmeiro Americano e o meio MS5 (Bolyard et al. 1991) tinha sido utilizado para este último e também para o ulmeiro Chinês (Tabela 3.3). Nos dois ensaios efectuados, nenhuma das folhas cultivadas no meio DKW2 e no meio MS5 formou rebentos. As folhas colocadas nestes meios produziram apenas, na sua periferia, calo friável, branco ou amarelo claro mantendo-se a parte central do limbo clorofilina e sem desdiferenciação. O único meio que promoveu a formação de rebentos foi o meio DKW1BAP.

Como nestes primeiros ensaios os meios aqui identificados como DKW2 e MS5 não formaram nenhum rebento, estes foram abandonados e foi apenas seleccionado o meio DKW1BAP. Para além disso, como as folhas utilizadas se mostraram muito pouco

reactivas, optou-se pela utilização de folhas provenientes de rebentos no meio DKW1 (Cap. 2). Desta forma, testaram-se em DKW1BAP duas condições que foram a execução, ou não, de cortes transversais à nervura central. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 Resultados da regeneração de rebentos em folhas *in vitro* colocadas no meio DKW1BAP. Os resultados são referentes à percentagem de folhas que regeneraram rebentos e reportam-se a dois ensaios independentes globalizando 37 réplicas para cada uma das condições, com 5 a 6 folhas por réplica. No total foram usadas 202 folhas cortadas e 212 folhas não cortadas. Os valores apresentados são a média \pm o erro padrão e os valores seguidos de letra diferente são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

	Folhas cortadas	Folhas não cortadas
Folhas com regeneração de rebentos (%)	43,1 \pm 1,37 a	37,7 \pm 1,79 b

Pela observação da Tabela 3.5 pode-se depreender que a execução de cortes perpendiculares à nervura principal desencadeou uma maior resposta das folhas. Devido a esta acção, a percentagem de folhas que mostraram regeneração de rebentos foi superior nas folhas cortadas, relativamente às folhas não cortadas. Este resultado foi devido ao alargamento dos locais de resposta, uma vez que as folhas não cortadas limitaram a sua resposta ao pecíolo enquanto as outras apresentaram também resposta nas zonas cortadas da folha.

Durante a primeira semana as folhas não manifestaram grande alteração excepto algum intumescimento que, principalmente no caso das folhas não cortadas, provocava o seu enrolamento e o consecutivo afastamento do meio de cultura. Cerca de uma semana mais tarde, foi visível a produção de um calo amarelado ao nível do pecíolo e zonas de corte (Fig. 3.3A). Às quatro semanas, em algumas dessas zonas com calo, observaram-se os primeiros rebentos (Fig. 3.3B) e, a partir das cinco semanas, os rebentos já estavam em alongamento (Fig. 3.3C). Esta foi a forma de obtenção de rebentos mais observada que, devido à intervenção do calo, deverá ser designada como uma regeneração por via indirecta (Fig. 3.3 D). No entanto, a regeneração de rebentos via organogénese directa foi também verificada (Fig. 3.3E). Nesses casos não houve produção de calo e os rebentos surgiram directamente da folha.

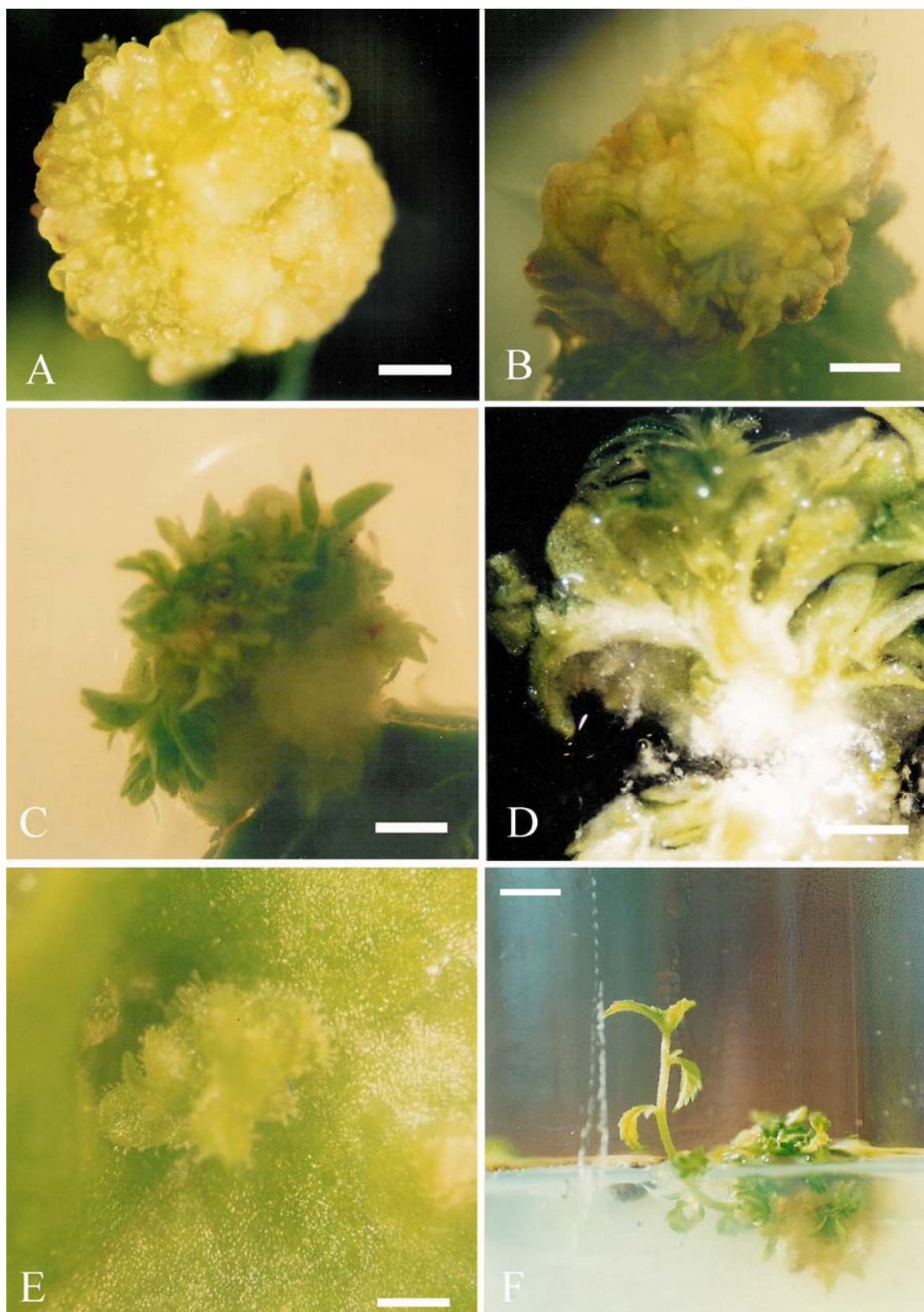


Figura 3.3 Produção de rebentos em folhas cultivadas no meio DKW1BAP. (A) Início da produção de calo ao nível do pecíolo (a barra vale 1 mm). (B) Observação da formação de numerosos rebentos ao nível do pecíolo (a barra vale 5 mm). (C) Rebentos em alongamento formados numa zona de corte da folha (a barra

vale 5 mm). (D) Material anterior visto em corte que evidencia a origem indirecta dos rebentos no calo formado previamente (a barra vale 5 mm). (E) Exemplo de rebentos que surgiram directamente no tecido da folha (a barra vale 1 mm). (F) Grupo de rebentos formados ao nível do pecíolo, que se encontram em alongamento após a sua subcultura para o meio DKW1 (a barra vale 1 cm).

Devido ao desenvolvimento simultâneo de rebentos via organogénese directa e indirecta, considerou-se que esta forma de micropropagação era incerta e, por isso, o número de rebentos obtidos por folha não foi contabilizado. Apesar de não ter sido efectuada uma quantificação exaustiva do número de rebentos, chegaram a ser contabilizados mais de vinte rebentos formados ao nível do pecíolo (Fig. 3.3F) e noutras zonas de regeneração. Estes rebentos alongaram e proliferaram quando transferidos para o meio de micropropagação DKW1 e, a nível morfológico, mostraram-se semelhantes aos subcultivados rotineiramente naquele meio, a partir de outros tipos de explante (Fig. 3.3F).

3.4 Discussão e Conclusão

3.4.1 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta

3.4.1.1 Produção de calo em folhas

Os meios aqui testados na produção de calo a partir de folhas foram meios baseados nos que foram empregues pelos diferentes grupos de investigação na produção de calo de outras espécies de *Ulmus* (Tabela 3.1). Nomeadamente, os meios MS1 (Corchete et al. 1993) e B5 (Duchesne et al. 1994) foram usados na produção de calo para estudos da resposta deste à inoculação com filtrados de cultura do fungo, o meio MS2 (Fink et al. 1986) foi usado na produção de calo para posteriormente testar a regeneração indirecta de rebentos e o meio MS3 (Sticklen et al. 1986) foi empregue na produção de calo para o isolamento de protoplastos.

Destes diferentes meios, apenas os meios MS1 e MS3 produziram calo em quantidade apreciável mas, o calo produzido em MS1 fenolizava facilmente e após a subcultura a sua produção foi muito inferior à de MS3. Por estas razões, o meio MS3 foi eleito, entre os vários meios testados, como o melhor meio para a produção de calo a partir de folhas de *U. minor*.

Tendo em conta a composição dos meios de cultura usados e sabendo que a composição dos três primeiros meios (MS1, MS2 e MS3, Tabela 3.1) diferiu apenas na combinação dos reguladores de crescimento, pode-se concluir que a utilização conjunta de uma auxina e de uma citocinina forneceu os melhores resultados, quanto à produção de calo, como é citado para grande parte dos trabalhos com este objectivo (Hartmann et al. 1997). Na presença conjunta de auxina e citocinina, a maior e melhor produção de calo foi registada quando a concentração da auxina era superior à da citocinina, que foi o caso do meio MS3. Na presença isolada da citocinina, ou quando a concentração da citocinina era muito próxima da da auxina, MS2 e D1, respectivamente, houve muito pouca desdiferenciação. Entre os meios MS1 e B5, que possuíam a mesma combinação e concentração de reguladores de crescimento, notou-se que o calo produzido era morfológicamente muito semelhante mas, em termos quantitativos, o meio com a composição do MS (Murashige e Skoog 1962) forneceu resultados muito superiores aos registados com a composição do meio B5 (Gamborg et al. 1968).

3.4.1.2 Regeneração de rebentos por organogénese indirecta a partir de calo

Entre os vários trabalhos de organogénese indirecta em torno do género *Ulmus*, houve duas publicações que se debruçaram mais em particular sobre este tipo de regeneração de rebentos. A primeira verificou-se com calo de internó que esverdeava em presença de luz quando transferido para meio com 10 μM (2,3 mg/l) de BAP, dando origem a pequenos rebentos (Fink et al. 1986). Na segunda publicação, esta regeneração foi conseguida em microcalos produzidos a partir de protoplastos, usando mais uma vez BAP como citocinina em concentrações que variavam entre 10 a 30 μM (2,3 a 6,8 mg/l) (Sticklen et al. 1986). Ambas as publicações referiram que os calos colocados em meio com Kn, como substituto de BAP, não mostraram diferenciação. Estes resultados foram aqui confirmados, uma vez que na presença de Kn não foi observado esverdeamento nem organogénese.

Aquelas publicações foram ainda concordantes num outro aspecto desta regeneração. O alongamento dos rebentos foi conseguido por transferência dos explantes, depois de fraccionados em pequenos pedaços, para meios com 2 e 2,5 μM (0,5 e 0,6 mg/l)

de BAP, o que corresponde a uma redução da citocinina do meio de regeneração para cerca de um quarto da sua concentração inicial. No entanto, no trabalho aqui apresentado, a utilização de um meio com redução da concentração de BAP naquela proporção, de 1 para 0,25 mg/l de BAP (DKW 0,25BAP), forneceu apenas resultados semelhantes aos obtidos no próprio meio de regeneração, havendo apenas um alongamento esporádico dos rebentos (Tabela 3.4).

Bonga e Aderkas (1992) referiram que, frequentemente, devido a uma elevada exposição ao BAP, os efeitos deste regulador podem-se arrastar por muito tempo fazendo com que haja uma contínua produção de rebentos que não alongam ou não enraízam. Tendo isto em conta, uma hipótese a colocar seria a de que a acumulação endógena da citocinina poderia ser a razão do impedimento do alongamento dos rebentos aqui obtidos. Como teste desta hipótese, foi realizado o ensaio em que os explantes com rebentos foram transferidos para meio com carvão activado na concentração de 0,5% (p/v). Segundo Bonga e Aderkas (1992), nesta situação a citocinina libertada pelos tecidos liga-se ao carvão activado que impede assim a sua reabsorção de forma a permitir o alongamento dos rebentos. Aparentemente, este objectivo teria sido atingido uma vez, com este procedimento, 49,4% dos rebentos alongaram. No entanto, Biondi et al. (1984), num ensaio em que também utilizaram carvão activado, chegaram a uma conclusão diferente desta. Estes autores analisaram os níveis de BAP endógeno em rebentos de *U. campestris* transferidos para meio basal, com ou sem carvão activado. Para estes o nível de BAP dos rebentos colocados em presença do carvão activado manteve-se comparável ao dos rebentos subcultivados em meio sem este. Estes autores referiram ainda que os níveis de BAP desciam muito rapidamente quando os rebentos eram transferidos para meio basal. Tendo isto em conta, a causa do alongamento aqui observado após a transferência para meio com carvão activado poderá ser outra. Segundo Bonga e Aderkas (1992), quando autoclavado o carvão activado diminui o pH e, nessas condições, o agente gelificante confere menor rigidez ao meio de cultura. Foi este o efeito observado no meio de cultura com carvão activado. Pode então pôr-se a hipótese de ser esta a causa que provocou o alongamento dos rebentos, uma vez que o material no meio DKW1BAP se mostrou sempre muito endurecido. O facto de os rebentos em alongamento apresentarem caules retorcidos e folhas enrugadas corrobora esta hipótese, pois isto demonstra que o material se encontrava muito comprimido.

Tendo em conta os assuntos acima discutidos, a percentagem de regeneração de rebentos via organogénese indirecta poderá ser incrementada se a este protocolo forem acrescentados os seguintes aspectos: 1) empregar um meio de cultura com menor rigidez, do que o aqui utilizado, dado que nestas condições os explantes mostraram sempre um enorme endurecimento, que mostrou ser desvantajoso; 2) uma vez que em meio basal os rebentos não alongaram e, segundo Biondi et al. (1984), os níveis de BAP descem muito rapidamente quando este regulador de crescimento não está presente, a adição de BAP parece ser necessária ao alongamento e outras concentrações, para além da aqui usada (0,25 mg/l BAP), deverão ser testadas.

3.4.2 Regeneração de rebentos por organogénese em folhas

A utilização de folhas para a regeneração de rebentos por organogénese foi citada em vários trabalhos de micropropagação do género *Ulmus*. No trabalho aqui descrito foram testados três desses meios. O meio DKW1BAP que tinha sido usado para o ulmeiro Inglês (*U. procera*) (Fenning et al. 1993). O meio DKW2 que foi usado para o ulmeiro Americano (George e Tripepi 1994) e o meio MS5 que foi usado para este último e para o ulmeiro Chinês (*U. parvifolia*) (Bolyard et al. 1991).

Os meios DKW2 e MS5 continham TDZ, um composto que exibe actividade de citocinina e que é útil na regeneração de rebentos a partir de folhas e na proliferação de rebentos de várias espécies (Bolyard et al. 1991). Os resultados positivos que foram publicados com estes meios não foram, no entanto, aqui confirmados. A utilização de TDZ apenas promoveu a formação de calo que rapidamente acastanhou e não se verificou qualquer diferença de resultado entre as duas concentrações utilizadas embora estas fossem muito diferentes (1 μ M de TDZ em MS5 e 15 μ M de TDZ em DKW2). Por seu lado, o terceiro meio que foi utilizado, DKW1BAP, que possuía BAP na sua constituição, promoveu apenas a regeneração esporádica de rebentos ao nível do pecíolo. Provavelmente, estes resultados serão devidos ao tipo de folha que foi utilizado uma vez que, nestes ensaios, as folhas mostraram-se pouco reactivas quando colocadas *in vitro*.

Pelas razões acima apontadas, nos ensaios posteriores efectuados com o meio DKW1BAP foram utilizadas folhas de rebentos micropropagados no meio DKW1. Em

condições semelhantes às aqui utilizadas, Fenning et al. (1993) obtiveram uma percentagem de regeneração (% de folhas que regeneram rebentos) de 20%, um valor bastante inferior à percentagem de regeneração aqui obtida que atingiu os 37,7%. Para além disso, contrariamente ao descrito pelos autores, a realização de cortes perpendiculares à nervura principal aumentou a frequência de regeneração, no genótipo aqui testado, para 43,1%. Kapaun e Cheng (1997) que utilizaram o meio MS como meio basal e BAP na concentração de 5 μ M, obtiveram também uma percentagem de regeneração de 34%, superior à de Fenning et al. (1993), utilizando folhas cortadas do ulmeiro Siberiano.

Em relação à origem dos rebentos, Fenning et al. (1993) defenderam que os meristemas eram formados directamente na folha sendo rapidamente cobertos por calo. Com o genótipo aqui testado, alguns casos de formação por organogénese directa de rebentos foram também visualizados mas, a situação mais frequente, foi a produção de um calo organogénico que posteriormente dava origem aos rebentos. Fink et al. (1986) observaram, de igual forma, a formação de rebentos com as duas origens em folhas de *Ulmus* x Pioneer utilizando o meio MS com 2 a 4 μ M de BAP. Por seu lado, George e Tripepi (1994) também referiram que a enorme quantidade de calo produzida nos explantes de folha de ulmeiro Americano, colocados em meio DKW com 7, 5, 15 e 22,5 μ M de BAP ou de TDZ, tornaram difícil a determinação da origem dos rebentos. Os autores referiram que, na maior parte dos casos, os rebentos formavam-se a partir do calo em vez de directamente na folha.

Em conclusão, apesar de boas percentagens de regeneração terem sido obtidas com a utilização de TDZ, em outras espécies de ulmeiro, a utilização deste composto não forneceu bons resultados para *U. minor*, nas condições utilizadas. Em estudos futuros seria aconselhável testar o efeito do TDZ em folhas provenientes da cultura *in vitro*, que mostraram melhor resposta a este ensaio. No entanto, apesar de os dados publicados referirem que as frequências de regeneração de rebentos com TDZ eram superiores às obtidas com BAP, frequentemente, os rebentos obtidos por intervenção daquele composto tinham dificuldade de alongamento. Este aspecto negativo foi descrito em dois trabalhos que compararam a acção do TDZ contra a de BAP (George e Tripepi 1994; Kapaun e Cheng 1997). Para além disso, George e Tripepi (1994) referiram ainda que os rebentos formados em meio com TDZ apresentavam, após excisão, uma menor taxa de sobrevivência que os induzidos com BAP.

Ao contrário dos resultados obtidos com TDZ, a utilização de BAP forneceu percentagens de regeneração superiores às obtidas para outras espécies do género *Ulmus*, com concentrações de BAP semelhantes à concentração aqui empregue (Fenning et al. 1993; Kapaun e Cheng 1997). Variações na concentração desta citocinina poderão, posteriormente, ser testadas, no sentido de promover apenas a formação directa de rebentos.

Referências bibliográficas

- Ben Jouira H, Bigot C, Dorion N (2000)** Plant regeneration from leaves of *Ulmus* x 'Commelin'. ISHS Acta Horticulturae 520: XXV International Horticultural Congress, Part 10: Application of Biotechnology and Molecular Biology and Breeding – In Vitro Culture. Brussels, Belgium
- Biondi S, Canciani L, Bagni N (1984)** Uptake and translocation of benzyladenine by elm shoots cultured in vitro. Canadian Journal of Botany 62: 2385-2390
- Bolyard MG, Srinivasan C, Cheng J, Sticklen M (1991)** Shoot regeneration from leaf explants of American and Chinese elm. HortScience 26: 1554-1555
- Bonga JM, Aderkas PV (1992)** Media preparation. In: In Vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 12-53
- Corchete MP, Diez JJ, Valle T (1993)** Phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Ulmus pumila* and *U. campestris* treated with spores of *Ceratocystis ulmi*. Plant Cell Reports 13: 111-114
- Domir SC, Schreiber LR, Ichida JM (1991)** Factors affecting growth of *Ophiostoma ulmi* on elm callus tissue. Journal of Environmental Horticulture 9: 211-215
- Domir SC, Schreiber LR, Ichida JM, Eshita SM (1992)** Effect of elm selection, explant source and medium composition on growth of *Ophiostoma ulmi* on callus cultures. Journal of Environmental Horticulture 10: 59-62
- Domir SC, Sticklen MB, Pijut PM, Bolyard MG, Lineberger RD (1993)** Micropropagation and regeneration of DED-resistant elms using protoplast and tissue culture techniques. In: Sticklen MB and Seraldi JM (ed.s) Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. Springer-Verlag, New York, pp: 81-88
- Dorion N, Danthu P, Bigot C (1987)** Multiplication végétative in vitro de quelques espèces d'ormes. Ann. Sci. For. 44: 103-118

- Driver JA, Kuniyuki AH (1984)** In vitro propagation of paradox walnut rootstock. HortScience 19: 507-509
- Duchesne LC, Jeng RS, Hubbes M, Sticklen MB (1994)** Accumulation of mansonones E and F in elm callus cultures inoculated with *Ophiostoma ulmi*. Canadian Journal of Plant Pathology 16: 118-121
- Durzan DJ, Lopushanski SM (1975)** Propagation of American elm via cell suspension cultures. Canadian Journal of Forestry Research 5: 273-277
- Dytham C (1999)** Choosing and Using Statistics, A Biologist's Guide. Blackwell Science Ltd, Oxford, 215 pp
- Eshita SM, Kamalay JC, Gingas VM, Yaussy DA (2000)** Establishment and characterization of American elm cell suspension cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture 61: 245-249
- Fenning TM, Gartland KMA, Brasier CM (1993)** Micropropagation and regeneration of english elm, *Ulmus procera* Salisbury. Journal of Experimental Botany 44: 1211-1217
- Fink CVM, Sticklen MB, Lineberger RD, Domir SC (1986)** In vitro organogenesis from shoot tip, internode, and leaf explants of *Ulmus* x 'Pioneer'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7: 237-245
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968)** Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151
- George EF (1993)** Plant growth regulators. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd., pp. 420-476
- George MW, Tripepi RR (1994)** Cytokinins, donor plants and time in culture affect shoot regenerative capacity of American elm leaves. Plant Cell Tissue and Organ Culture 39: 27-36
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (1997)** Principles of tissue culture for micropropagation. In: Plant Propagation: Principles and Practices (6th ed.). International Edition, pp. 549-589
- Heller R (1953)** Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux, cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Paris 14: 1-223
- Kapaun JA, Cheng Z (1997)** Plant regeneration from leaf tissues of siberian elm. HortScience 32: 301-303
- Karnosky DF, Mickler RA, Lange DD (1982)** Hormonal control of shoot and root induction in hypocotyl callus cultures of American elm. In Vitro 18: 275
- Morel G, Wetmore RH (1951)** Fern callus tissue culture. American Journal of Botany 38: 141-143
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497

- Pijut PM, Domir SC, Lineberger RD, Schreiber LR (1990)** Use of culture filtrates of *Ceratocystis ulmi* as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. Plant Science 70:191-196
- Schreiber LR, Domir SC (1994)** Efficacy of criteria to identify aggressiveness in *Ophiostoma ulmi* and resistance in American elm germ plasm. Plant Disease 78: 629-632
- Sticklen MB, Domir SC, Lineberger RD (1986)** Shoot regeneration from protoplasts of *Ulmus* x 'Pioneer'. Plant Science 47: 29-34
- Valle T, López JL, Hernández JM, Corchete P (1997)** Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. Plant Science 125: 97-101
- Zhang S, Lemaux PG (2004)** Molecular analysis of *in vitro* shoot. Critical Reviews in Plant Sciences 23: 325-335

Capítulo 4

Isolamento e cultura de protoplastos de *Ulmus minor* Mill.

Parte do trabalho apresentado neste capítulo foi publicado em:

Conde P, Santos C (2006) An efficient protocol for ~~elm~~ (*Ulmus minor* Mill.) protoplast isolation and culture [in agarose droplets](#). Plant Cell Tissue and Organ Culture 83: 359-366

Conde P, Santos C, Sousa A and Caldeira G (1999) Studies on factors affecting protoplast isolation and culture of *Ulmus minor* Mill. Forest Biotechnology' 99. A Joint Meeting of the International Wood Biotechnology Symposium and IUFRO Working Party on Molecular Genetics of Trees. University of Oxford, United Kingdom, 11-16 July (Poster)

4 Isolamento e cultura de protoplastos de *Ulmus minor* Mill.

Sumário

Neste capítulo procedeu-se ao isolamento e cultura de protoplastos de *U. minor* estabelecendo-se para o efeito um protocolo eficiente e reprodutível para cada fase.

Para o isolamento, utilizou-se como fonte de material folhas de plantas *in vitro* e de estufa e calo. Diversas combinações e concentrações de enzimas digestivas foram utilizadas e foram realizados testes comparativos entre as celulases Cellulase Onozuka RS e Cellulase Onozuka R10, sendo a primeira mais eficaz. De igual forma, foi testado o uso de duas pectinases, Macerozyme Onozuka R10 e Pectinase (Sigma®), com resultados de eficácia semelhantes. Das três fontes de material usadas, a folha *in vitro* mostrou ser a mais produtiva com um rendimento de $3,96 \times 10^7$ protoplastos por grama de peso fresco.

Em relação à cultura, apenas foram cultivados protoplastos de folhas *in vitro*. Três diferentes métodos de cultura de protoplastos foram ensaiados. A cultura em meio líquido, a cultura em meio líquido sobre meio sólido de agarose e a cultura em gotas de agarose. O meio de cultura de Kao e Michayluk (1975) foi testado, pela primeira vez, na cultura de protoplastos de folha de ulmeiro. Após algumas modificações, este meio e o vantajoso método de cultura em gotas de agarose fomentaram a produção de colónias e de microcalos usando uma densidade de plaqueamento de 2×10^5 protoplastos/ml. Dez semanas após o início da cultura, uma eficiência de plaqueamento de 2,7% foi atingida e os maiores microcalos possuíam entre 0,5 - 1 mm de diâmetro. Os microcalos foram posteriormente transferidos para um meio de produção de calo embriogénico, dando assim início a uma via alternativa de regeneração de plantas a partir de protoplastos.

4.1 Introdução

Os primeiros estudos de isolamento e cultura de protoplastos de ulmeiro surgiram com o propósito de ultrapassar a incompatibilidade sexual verificada entre o ulmeiro Americano e as outras espécies de *Ulmus*. O objectivo final destes estudos era obter produtos de fusão entre este ulmeiro susceptível e algumas das espécies Asiáticas que mostravam resistência. Redenbaugh et al. (1980) foram os primeiros a isolar alguns protoplastos de células mãe de esporos, tétradas e microsporos de *U. americana*. Apesar dos esforços, a regeneração de parede celular e a divisão celular não foram observadas. Seguidamente, os mesmos autores (Redenbaugh et al. 1981) isolaram protoplastos de cotilédones e calo de *U. americana*, *U. pumila* e *U. parvifolia*. Neste trabalho foram também realizadas experiências de fusão com PEG, mas apenas foram obtidos quatro produtos de fusão entre protoplastos de *U. pumila*. Uns anos mais tarde, Sticklen et al. (1985) publicaram o isolamento e cultura de protoplastos a partir de calo de internó do híbrido ‘Homestead’. Contudo, apesar de a divisão celular ter sido verificada, nenhum dos calos produzidos regenerou rebentos. Este mesmo grupo publicou, posteriormente, um outro trabalho de isolamento e cultura de protoplastos a partir de calo de folha do híbrido *Ulmus* x Pioneer (Sticklen et al. 1986). Embora a eficiência de plaqueamento fosse inferior à obtida com ‘Homestead’, 10% dos calos produziram rebentos e alguns destes alongaram, sendo posteriormente enraizados, dando origem ao primeiro exemplo de um sistema de regeneração de plantas a partir de protoplastos de ulmeiro. Entretanto, um grupo em França tinha iniciado também a sua pesquisa neste campo, usando como fonte de protoplastos folhas de plantas mantidas em estufa de *U. americana*, *U. laevis* e *U. campestris* (Dorion et al. 1983). Nesta primeira abordagem, a cultura de protoplastos a partir de folhas de plantas de estufa foi ensaiada sem sucesso (Dorion et al. 1994). Mais tarde, este objectivo foi alcançado usando folhas de plantas micropropagadas de apenas um clone de *U. minor* e dos híbridos Holandeses ‘Dodoens’ e ‘Sapporo gold’ (Dorion et al. 1994). No início dos anos noventa, novas experiências de fusão foram realizadas usando protoplastos de cotilédone do ulmeiro Americano e protoplastos de calo do híbrido ‘Pioneer’. Da mistura resultante, 15% dos protoplastos observados eram produtos de fusão não tendo, no entanto, sido observada qualquer regeneração de plantas provenientes de híbridos somáticos (Domir et al. 1993).

Nos últimos anos, Gartland et al. (2005) apresentaram um trabalho em que referem a transformação do ulmeiro Inglês com resistência a fungos. No entanto, como foi recentemente afirmado por Davey et al. (2005) os protoplastos continuam a ser uma ferramenta vantajosa em estudos de melhoramento genético. A obtenção de híbridos somáticos, por fusão de protoplastos, e a introdução de DNA em protoplastos são técnicas que podem facultar a produção de novas plantas. No caso do ulmeiro, o objectivo é a obtenção de plantas com capacidade de resistência à doença, sem a perda das características próprias pelas quais estas foram seleccionados e cultivadas ao longo do tempo (Sticklen et al. 1994; Gartland et al. 2000, 2001). A fusão de protoplastos de ulmeiro merece especial atenção, uma vez que existem espécies tolerantes ao fungo, nomeadamente as espécies Asiáticas (Smalley e Guries 2000), que podem transferir os seus genes para as espécies susceptíveis. No entanto, antes de os protoplastos poderem ser usados em programas de manipulação de plantas, um sistema eficiente de isolamento, cultura e regeneração de plantas tem de ser implementado. Este capítulo apresenta o desenvolvimento de protocolos de isolamento e cultura de protoplastos, que foram comparados com os de trabalhos anteriormente realizados para o género. O objectivo final foi desenvolver protocolos detalhados e de fácil reprodução, que possam ser testados em outros genótipos e/ou espécies de *Ulmus*, permitindo desta forma uma mais rápida aquisição de traços de resistência pelos ulmeiros sensíveis.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Isolamento de protoplastos

4.2.1.1 Isolamento e purificação de protoplastos de calo

Fonte de material - No isolamento de protoplastos de calo foram utilizados calos friáveis, isentos de fenolização, mantidos em 1/2 MS3 (Cap. 3) com subcultura realizada três semanas antes do isolamento. As enzimas utilizadas nestes ensaios foram dissolvidas em CPW 13M (Tabela 4.1) e as diferentes combinações e concentrações de enzimas encontram-se descritas na Tabela 4.3.

Protocolo seguido no isolamento e purificação de protoplastos de calo:

- 1) Colocar numa caixa de petri (60 x 15 mm) 10 ml de mistura enzimática esterilizada por filtração (ver nota a). Pesar cerca de 4 g de calos e colocar os calos na mistura enzimática. Cortar os calos em pequenas porções com uma lâmina de bisturi. Selar a caixa com Parafilm® e colocar num agitador orbital (40 rpm) a uma temperatura de 24 ± 2 °C durante 15 h na obscuridade.
- 2) Após este período de digestão, aspirar e expelir muito lentamente (ver nota b) a suspensão com uma pipeta pasteur, para libertar os protoplastos. Prolongar o tempo de digestão até às 16 h.
- 3) Filtrar cuidadosamente a suspensão por filtro de nylon de poro 80 µm (ver nota c), humedecendo antes o filtro com CPW 13M. Lavar a caixa e o filtro com CPW 13M e recolher a suspensão.
- 4) Colocar muito lentamente a suspensão sobre 8 ml de CPW 21S (Tabela 4.1) num tubo de centrífuga de 15 ml, inclinando o tubo e evitando que as duas soluções se misturem. Centrifugar a 100 x g durante 6 minutos. Recolher a banda de protoplastos com o auxílio de uma pipeta pasteur num pipetador automático, aspirando com muito cuidado.
- 5) Medir o volume final da suspensão e determinar a densidade dos protoplastos.

4.2.1.2 Isolamento e purificação de protoplastos de folha

Fonte de material - No isolamento de protoplastos de folha foram usadas plantas do genótipo F14 micropropagadas em DKW1 (Cap. 2), que foram subcultivadas dois meses antes do isolamento. Das plantas *in vitro* foram usadas as três primeiras folhas totalmente expandidas, mais próximas do ápice caulinar. Foram também utilizadas plantas de estufa, do mesmo genótipo, que se encontravam em crescimento activo. Das plantas de estufa foram apenas utilizadas as primeiras e segundas folhas, mais próximas do ápice caulinar. Várias combinações e concentrações de enzimas foram utilizadas (Tabela 4.4) tendo estas sido dissolvidas em CPW13M (Tabela 4.1).

Protocolo seguido no isolamento e purificação de protoplastos de folha:

- 1) Colocar numa caixa de petri (60 x 15 mm) 10 ml de CPW 13M. Adicionar a quantidade de folhas necessária para cobrir a superfície da solução (cerca de 200 mg), depois de determinar o seu peso. Cortar as folhas em tiras muito finas, perpendiculares à nervura principal, usando uma lamina de bisturi. Selar a caixa com Parafilm® e colocar no frigorífico a 6°C durante 1 h para pré-plasmólise.
- 2) Aspirar a solução e adicionar 10 ml da mistura enzimática (CPW 13M + enzimas) esterilizada por filtração (ver nota a). Selar a caixa com Parafilm® e colocar num agitador orbital (40 rpm) a uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 h na obscuridade.
- 3) Após este período de digestão, aspirar e expelir lentamente a suspensão com uma pipeta pasteur de ponta larga (ver nota b) para libertar os protoplastos. Prolongar o tempo de digestão até às 16 h.
- 4) Filtrar cuidadosamente a suspensão por rede de nylon de poro 280 μm (ver nota c), humedecendo antes o filtro com CPW 13M. Lavar a caixa e o filtro com 10 ml CPW 13M e recolher a suspensão para um tubo de 50 ml com mais 10 ml de CPW 13M (ver nota d). Rolhar o tubo e homogeneizar a suspensão rodando lentamente o tubo na horizontal.
- 5) Filtrar novamente a suspensão por rede de nylon de poro 80 μm . Distribuir a suspensão por quatro tubos de 50 ml e colocar os tubos em repouso durante 1 h no frigorífico, para sedimentação dos protoplastos.
- 6) Centrifugar a 40 x g durante 8 minutos. Despejar rapidamente o sobrenadante dos quatro tubos e ressuspender os protoplastos adicionando 1 ml de CPW 13M a um primeiro tubo, que lava sucessivamente os outros, juntando toda a suspensão no último tubo.
- 7) Colocar muito lentamente a suspensão sobre 8 ml de CPW 21S (Tabela 4.1) num tubo de centrífuga de 15 ml, inclinando o tubo e evitando que as duas soluções se misturem. Centrifugar a 100 x g durante 6 minutos. Recolher a banda de protoplastos, acima do CPW 21S, usando uma pipeta pasteur num pipetador automático.
- 8) Observar uma amostra da suspensão, n um microscópio invertido, para determinar se os protoplastos estão limpos de resíduos. Repetir o passo anterior se isto não acontecer.
- 9) Medir o volume final da suspensão e determinar a densidade e a viabilidade dos protoplastos.

10) Centrifugar a suspensão a 40 x g durante 8 minutos. Ressuspender num determinado volume de meio de cultura de forma a atingir a densidade de protoplastos com que se pretende fazer a cultura.

Tabela 4.1 Composição das soluções salinas CPW 13M, usada na digestão e ressuspensão dos protoplastos, e CPW 21S, usada na purificação dos protoplastos

Componentes da solução CPW (modificada de Power e Chapman (1985))	Concentração
Ca Cl ₂ .2H ₂ O	1480,0 mg/l
KNO ₃	101,0 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,0 mg/l
KH ₂ PO ₄	27,2 mg/l
KI	0,16 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/l
MES (5 mM)	1,066 g/l
PVP-10 (1%)*	10,0 g/l
pH	5,7
CPW 13M = CPW + 13% Manitol	+ 130,0 g/l Manitol
CPW 21S = CPW + 21% Sacarose	+ 210,0 g/l Sacarose

* adicionado apenas nas soluções com enzimas

Notas:

nota a) As misturas enzimáticas foram pré-filtradas usando um sistema de filtração Sartorius® com um filtro de 47 mm de diâmetro associado a uma bomba de vácuo, para remover as partículas insolúveis das enzimas e evitar assim o bloqueamento do filtro de esterilização. Na esterilização destas soluções foram usadas unidades filtrantes para seringa Millipore® com membranas filtrantes de polietersulfona de 0,22 µm de poro, que possuíam uma baixa adsorção de proteínas e que eram recomendadas para a filtração esterilizante de meios de cultura de tecidos.

nota b) Neste passo, e em todos os que envolveram o manuseamento da suspensão de protoplastos, foram usadas pipetas pasteur ou pontas de pró-pipetas com a extremidade cortada para que tivessem um maior diâmetro, evitando assim o rebentamento dos protoplastos.

nota c) As redes usadas para a filtração dos protoplastos foram fixadas em frascos baixos de boca larga, formando uma concavidade no centro da rede de forma que esta tocasse o fundo do frasco, promovendo uma filtração rápida e suave dos protoplastos.

nota d) A adição deste volume de CPW 13M foi necessária para diminuir a viscosidade da suspensão possibilitando a sedimentação dos protoplastos.

4.2.1.3 Determinação do rendimento e da viabilidade dos protoplastos

A densidade dos protoplastos foi determinada usando um hemacitômetro de Newbawer. Com a lamela colocada, as câmaras do hemacitômetro foram enchidas por capilaridade tocando com uma pipeta pasteur, com uma alícuta da suspensão de protoplastos, no bordo da lamela. A contagem do número de protoplastos foi efectuada na quadrícula central e nas quadrículas das esquinas de cada uma das câmaras do hemacitômetro. Este procedimento foi realizado uma segunda vez para outra alícuta da suspensão. No final, o número médio das 20 contagens foi calculado e este valor foi usado para determinar o número de protoplastos da suspensão, tendo em conta que cada quadrícula apresentava um volume de 10^{-4} cm³. O rendimento de protoplastos de cada ensaio foi então determinado usando a seguinte fórmula: nº total de pp = (nº médio pp por quadrícula x volume da suspensão em ml) / 10^{-4} ml. O rendimento, por grama de peso fresco de tecido, foi calculado pela seguinte fórmula: rendimento (nº pp / 1g p.f.) = nº total de protoplastos na suspensão / peso fresco do tecido em g.

O teste de viabilidade dos protoplastos foi efectuado usando diacetato de fluoresceína (DAF) e seguindo o método de Anthony et al. (1999). De um stock de DAF (3 mg/ml em acetona, mantido no escuro a 4 °C) retirou-se um volume de 100 µl e adicionou-se a 16 ml de CPW 13M. Misturou-se depois uma gota desta solução com uma gota da suspensão e observaram-se os protoplastos sob iluminação ultra-violeta. Utilizou-se para isso um Microscópio Invertido Leitz Fluovert FU ([Leica Microsystem Bensheim, Germany](#)) com uma lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão (50 W) e um filtro I3 (ref.^a 513828 Leica). A percentagem de protoplastos viáveis foi determinada contando o número de protoplastos verde-fluorescente sob luz ultra-violeta e, posteriormente, o número total de protoplastos sob luz visível. Desta forma a viabilidade dos protoplastos foi

expressa pela razão: viabilidade (%) = (n° pp fluorescentes x 100) / (n° pp fluorescentes + n° pp não fluorescentes).

4.2.2 Cultura de protoplastos de folha

Três diferentes métodos de cultura foram utilizados na cultura de protoplastos de mesófilo utilizando densidades de 1×10^5 , 2×10^5 e 3×10^5 pp/ml (protoplastos por ml) (Tabela 4.5). A composição dos meios de cultura que foram utilizados foi baseada na do meio de cultura 8p de Kao e Michayluk (1975). Em termos de reguladores de crescimento foi utilizada a combinação original de Kao e Michayluk (1975), a de Sticklen et al. (1986) usada em protoplastos de calo do híbrido *Ulmus* x Pioneer e a de Dorion et al. (1994) usada em protoplastos de folha do género *Ulmus*, sendo um deles um clone de *U. minor* (Tabela 4.5).

4.2.2.1 Cultura em meio líquido (CML)

Neste tipo de cultura, os protoplastos foram ressuspensos nos meios de cultura KM8p, KM8pmod.1 e KM8pmod.2 de forma a serem cultivados nas densidades indicadas na Tabela 4.5. Após este procedimento, 3 ml da suspensão de protoplastos foram colocados em caixas de petri (Tissue Culture Greiner®) de 60 x 15 mm. As caixas foram seladas com Parafilm® e colocadas na obscuridade dentro de uma caixa com um pouco de água estéril para manter a humidade relativa elevada. A temperatura da sala de cultura era de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e as placas foram observadas diariamente num Microscópio Invertido Fluovert FU Leitz® ([Leica Microsystem Bensheim, Germany](#)).

4.2.2.2 Cultura em meio líquido sobre meio sólido de agarose (CML/MS)

Nesta cultura, os protoplastos foram ressuspensos em 0,5 ml dos meios de cultura KM8p e KM8pmod.3 nas densidades indicadas na Tabela 4.5 e esta suspensão foi colocada

sobre 2,5 ml do mesmo meio solidificado com agarose Type VII Low Gelling Temperature Sigma ® a 1,2% (p/v) em caixas de petri (Tissue Culture, Greiner®) de 60 x 15 mm. As caixas foram seladas com Parafilm® e colocadas na obscuridade dentro de uma caixa com um pouco de água estéril para manter a humidade relativa elevada. A temperatura da sala de cultura era de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e as placas foram observadas diariamente num Microscópio Invertido Fluovert FU Leitz® ([Leica Microsystem Bensheim, Germany](#)).

4.2.2.3 Cultura em gotas de agarose (CGA)

Neste método de cultura os protoplastos foram cultivados nas duas densidades indicadas na Tabela 4.5 (1×10^5 e 2×10^5 pp/ml). O protocolo utilizado é descrito seguidamente e a divisão das células e o desenvolvimento de colónias foram visualizados num Microscópio Invertido Fluovert FU Leitz® ([Leica Microsystem Bensheim, Germany](#)) e numa lupa Olympus® SZ-PT (Olympus, Japan).

Protocolo de cultura em gotas de agarose:

- 1) Pipetar o meio de cultura, esterilizado por filtração, para um recipiente que contenha a agarose esterilizada a seco (ver nota e) (agarose Type VII Low Gelling Temperature Sigma ®) no dobro da sua concentração final (ver nota f).
- 2) Colocar esta mistura no microondas e aquecer lentamente até que a agarose se dissolva e a solução fique límpida, evitando a fervura.
- 3) Deixar arrefecer o meio com agarose até aos 37°C (ver nota g) e adicionar seguidamente igual volume da suspensão (ver nota f), que deverá ter o dobro da densidade de protoplastos com que se pretende fazer a cultura.
- 4) Distribuir pelo fundo de uma caixa de petri (Tissue Culture, Greiner®) de 35 x 10 mm, gotas de 40 μl do meio com os protoplastos ressuspensos (ver nota h).
- 5) Deixar as gotas solidificar durante cerca de uma hora, à temperatura ambiente, para que as gotas adiram ao fundo da caixa.
- 6) No final deste período, adicionar a cada caixa de petri 1 ml de meio líquido evitando cobrir totalmente as gotas.

- 7) Selar as caixas com Parafilm ® e incubar na obscuridade, a uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, num recipiente fechado e humedecido por colocação neste de papel absorvente embebido em água estéril.
- 8) Examinar periodicamente o desenvolvimento de colónias e, em intervalos de 7 dias, renovar metade do meio líquido adicionando o mesmo volume de meio com apenas 5% (p/v) de manitol.
- 9) Quando os microcalos atingirem cerca de 0,5 mm de diâmetro, transferir os microcalos para meio sólido de produção de calo embriogénico, em caixas de petri de 35 x 10 mm. O meio de cultura foi o da indução de calo embriogénico a partir de folha (I6 - MS com 2,3 μM de 2,4-D + 1,1 μM de Kn (Cap. 5)) mas, neste caso, o agente gelificante utilizado foi gelrite (2 g/l). Após esta transferência, manter os calos na obscuridade a uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Notas:

nota e) Pesar a agarose em pequenos recipientes, resistentes à esterilização a seco e ao microondas, com um volume superior ao necessário para o meio de cultura de forma que, em caso de fervura, não haja perigo de contaminação. Esterilizar a agarose numa estufa a 120°C durante 90 minutos.

nota f) A concentração final de agarose deverá ser igual a 1,2% (p/v) quando a suspensão com os protoplastos for adicionada ao meio com a agarose.

nota g) Deixar arrefecer o meio com a agarose até que se consiga tocar facilmente o recipiente com a mão, evitando assim o dano dos protoplastos mas, ao mesmo tempo, não deixar arrefecer em demasia, de forma a permitir a mistura das duas fases e a homogeneidade final do gel.

nota h) Cada caixa de petri deverá ficar com 10 a 11 gotas.

4.2.3 Análise estatística

A significância da diferença entre as médias dos rendimentos obtidos nas várias combinações enzimáticas foi analisada pela distribuição t-Student para $P \leq 0,05$. Antes da aplicação do teste t foi verificada a diferença entre as variâncias empregando o teste de Fisher (teste F) e, quando estas eram significativamente diferentes, foi realizado um teste t aproximado (Dytham 1999). Todos os cálculos foram efectuados usando o programa Microsoft® Excel X for Mac®.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Isolamento de protoplastos

4.3.1.1 Isolamento de protoplastos de calo

Como se pode verificar pela observação das Tabelas 4.2 e 4.3 os rendimentos resultantes da utilização das diferentes combinações enzimáticas foram sempre muito superiores a partir de folha do que a partir de calo. No entanto, os valores aqui obtidos para o calo $1,03 \times 10^5$ a $2,90 \times 10^5$ pp/g p.f. (protoplastos por grama de peso fresco) não foram inferiores aos publicados nos dois únicos trabalhos de isolamento de protoplastos deste tipo no género *Ulmus*. Utilizando calos dos híbridos ‘Homestead’ e ‘Pioneer’ os rendimentos obtidos situaram-se entre 2×10^2 e 2×10^5 pp/g p.f. (Sticklen et al. 1985; Sticklen et al. 1986). Naqueles isolamentos, os autores utilizaram uma celulase a 1,5% (Cellulysin) e uma pectinase a 0,5% (Macerase). Neste trabalho, embora não tenham sido utilizadas aquelas enzimas, a utilização de uma celulase com uma pectinase, naquelas concentrações (Tabela 4.2), permitiu obter um rendimento superior ao valor máximo apresentado para aqueles híbridos. Nas combinações enzimáticas testadas para calo a Cellulase [Onozuka R10](#) foi usada com duas pectinases, [Macerozyme Onozuka R10](#) e [Pectinase \(Sigma®\)](#). A primeira daquelas pectinases mostrou ser mais eficiente no isolamento de protoplastos de calo, dado que os rendimentos por ela produzidos foram significativamente superiores aos registados com a [Pectinase \(Sigma®\)](#) (Tabela 4.2). Por outro lado, a elevação da concentração da pectinase e da celulase não promoveu uma maior libertação de protoplastos, uma vez que os rendimentos obtidos não foram significativamente diferentes (Tabela 4.2).

Os protoplastos obtidos a partir de calo eram perfeitamente esféricos com tamanhos compreendidos entre 27,5 e 55,0 μm e possuíam imensas conexões citoplasmáticas que atravessavam o vacúolo (Fig. 4.1A).

Tabela 4.2 Rendimentos obtidos com as diferentes combinações de enzimas digestivas testadas no isolamento de protoplastos a partir de calo. Os valores representam as médias e os desvios padrão de dois isolamentos. Os valores seguidos de letra diferente são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Enzimas % (p/v)	Calo	Rendimento
		(protoplastos / grama peso fresco)
1,5% Cel. Onoz. R10 + 0,5% Mac. Onoz. R10		$2,85 \times 10^5 \pm 2,83 \times 10^3$ a
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Mac. Onoz. R10		$2,90 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^3$ a
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Pectinase		$1,03 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^3$ b

Cel. Onoz. R10 – Cellulase Onozuka® R10; e Mac. Onoz. R10 – Macerozyme Onozuka® R10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co.,Ltd); Pectinase (Sigma®)

4.3.1.2 Isolamento de protoplastos de folha *in vitro*

Nos isolamentos preliminares com folha, testou-se uma combinação de enzimas baseada na de Dorion et al. (1994) utilizada para folhas de *Ulmus*. Estes autores conseguiram isolar protoplastos de folhas jovens usando a seguinte combinação com as respectivas concentrações de enzimas digestivas: 0,2% Celullase Onozuka RS + 0,1% Driselase + 0,03% Pectolyase Y23. Na combinação testada, a Pectolyase Y23 foi substituída por Macerozyme Onozuka R10, por impossibilidade de aquisição da primeira. Esta combinação, nas concentrações acima referidas, não forneceu resultados positivos. Nos vários ensaios que foram realizados, as tiras de folha ficaram apenas macias e não houve qualquer libertação de células ou de protoplastos. Por esta razão, escolheram-se posteriormente novas combinações enzimáticas (Tabela 4.3), usando as enzimas que havia disponíveis e as combinações referidas com sucesso num artigo de revisão de isolamento de protoplastos de folhas de lenhosas (Kirby et al. 1989). Aquelas combinações eram, de uma forma geral, constituídas apenas por uma celulase e uma pectinase e as concentrações variavam entre 0,5 e 2,0% para a celulase e 0,1 e 0,5% para a pectinase, concentrações estas que eram bastante superiores às utilizadas por Dorion et al. (1994). Testaram-se então as combinações e concentrações indicadas na Tabela 4.3 com especial ênfase para a comparação entre a Cellulase Onozuka R10 e a Cellulase Onozuka RS. Para além disso,

testou-se a influência da adição de 0,1% de Driselase, uma vez que esta segunda celulase estava presente na combinação utilizada por Dorion et al. (1994).

Tabela 4.3 Rendimentos das diferentes combinações de enzimas testadas no isolamento de protoplastos das três primeiras folhas de plantas *in vitro*. Os valores são as médias e desvios padrão de dois a quatro isolamentos para cada combinação. Os valores seguidos de letra diferente são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$). Os testes estatísticos foram efectuados entre as várias combinações com a mesma celulase, e entre as combinações que apenas diferiam na celulase, para testar a eficácia das enzimas

Folhas <i>in vitro</i>	
Enzimas % (p/v)	Rendimento (protoplastos / grama peso fresco)
Testes estatísticos entre as combinações com Cellulase R10	
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Mac. Onoz. R10	$7,04 \times 10^6 \pm 1,68 \times 10^6$ a
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Mac. Onoz. R10 + 0,1% Driselase	$1,00 \times 10^7 \pm 3,68 \times 10^5$ a
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Pectinase	$1,04 \times 10^7 \pm 1,15 \times 10^6$ a
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Pectinase + 0,1% Driselase	$1,07 \times 10^7 \pm 2,06 \times 10^6$ a
Testes estatísticos entre as combinações com Cellulase RS	
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Mac. Onoz. R10	$2,64 \times 10^7 \pm 1,45 \times 10^7$ a
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Mac. Onoz. R10 + 0,1% Driselase	$2,98 \times 10^7 \pm 7,35 \times 10^6$ a
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Pectinase	$2,72 \times 10^7 \pm 1,96 \times 10^7$ a
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Pectinase + 0,1% Driselase	$3,96 \times 10^7 \pm 1,24 \times 10^7$ a
2,0% Cel. Onoz. RS + 0,5% Mac. Onoz. R10	$3,17 \times 10^7 \pm 1,03 \times 10^7$ a
Testes estatísticos entre as combinações com Cellulase R10 ou RS	
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Mac. Onoz. R10	$7,04 \times 10^6 \pm 1,68 \times 10^6$ a
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Mac. Onoz. R10	$2,64 \times 10^7 \pm 1,45 \times 10^7$ b
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Mac. Onoz. R10 + 0,1% Driselase	$1,00 \times 10^7 \pm 3,68 \times 10^5$ a
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Mac. Onoz. R10 + 0,1% Driselase	$2,98 \times 10^7 \pm 7,35 \times 10^6$ a
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Pectinase	$1,04 \times 10^7 \pm 1,15 \times 10^6$ a
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Pectinase	$2,72 \times 10^7 \pm 1,96 \times 10^7$ b
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Pectinase + 0,1% Driselase	$1,07 \times 10^7 \pm 2,06 \times 10^6$ a
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Pectinase + 0,1% Driselase	$3,96 \times 10^7 \pm 1,24 \times 10^7$ b
Cel. Onoz. RS – Cellulase Onozuka® RS; Cel. Onoz. R10 – Cellulase Onozuka® R10; Mac. Onoz. R10 – Macerozyme Onozuka R10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co.,Ltd); Driselase (de <i>Basidiomycetes</i> Sigma®); Pectinase (de <i>Rhizopus</i> sp. Sigma®)	

Em todas as combinações de enzimas que foram testadas houve sempre produção de protoplastos. Notoriamente, o factor principal que desencadeou este resultado parece ter sido a elevação da concentração das enzimas, uma vez que, a combinação que tinha sido preliminarmente testada, sem sucesso, fornecia agora resultados positivos. Esta poderá ser

a razão para o facto de Dorion et al. (1983) referirem que a combinação de Cellulase Onozuka R10 com a Macerozyme R10 era ineficaz na produção de protoplastos de *Ulmus*, uma vez que as baixas concentrações por eles usadas são geralmente referidas para espécies herbáceas de mais fácil digestão (Power e Chapman 1985).

O uso das celulases Onozuka R10 e Onozuka RS foi comparado testando os rendimentos obtidos em combinações enzimáticas que apenas diferiam na celulase (Tabela 4.3). Apenas o par de combinações com 1,0% Cellulase Onoz. R10 ou RS + 0,25% Macerozyme Onoz. R10 + 0,1% Driselase mostrou rendimentos que não eram significativamente diferentes. Todos os outros pares de combinações mostraram que os rendimentos fornecidos pela Cellulase Onozuka RS eram significativamente superiores aos registados com a Cellulase Onozuka R10. Os testes estatísticos também mostraram que os rendimentos obtidos com as combinações enzimáticas que possuíam a mesma celulase não eram significativamente diferentes. Estes dados provaram que as pectinases aqui utilizadas foram da mesma forma efectivas na produção de protoplastos de ulmeiro e que a adição da Driselase não demonstrou qualquer vantagem.

Apesar de não se verificarem diferenças significativas entre as diferentes combinações enzimáticas que possuíam a mesma celulase (Tabela 4.3), os valores obtidos nos diferentes isolamentos de uma mesma combinação foram, no entanto, bastante variáveis. Mesmo tendo o cuidado de padronizar toda a técnica de isolamento e de usar material em estado de desenvolvimento semelhante, houve sempre uma grande diferença de valores, de isolamento para isolamento. Por exemplo, na combinação 1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Mac. Onoz. R10 o valor máximo obtido foi de $4,69 \times 10^7$ pp/g p.f. e o valor mínimo foi de $1,40 \times 10^7$ pp/g p.f. Dorion et al. (1994) também referiram, no seu trabalho, uma grande variabilidade de resultados de uma experimentação para outra.

Os dados aqui obtidos contrastam com os de Dorion et al. (1994) que referiram a necessidade de usar uma pectinase mais activa como a Pectolyase Y23 (Ishii 1989) (uma enzima muito dispendiosa) e que, entre as celulases, apenas a Cellulase RS era eficiente. Este grupo referiu que com folhas de um clone de *U. minor*, micropropagado durante sete anos, atingiram uma média de $3,7 \times 10^7$ pp/g p.f. No nosso caso, e usando folhas de material que já vinha sendo micropropagado há cinco anos, os rendimentos obtidos variaram entre $2,64 - 3,96 \times 10^7$ pp/g p.f., usando a Cellulase Onozuka RS, valores estes que estão muito próximos do acima referido.

Os protoplastos obtidos a partir de folha eram perfeitamente esféricos com um elevado número de cloroplastos e com diâmetro que variava entre 10 e 25 μm (Fig.s 4.1B e 4.1C).

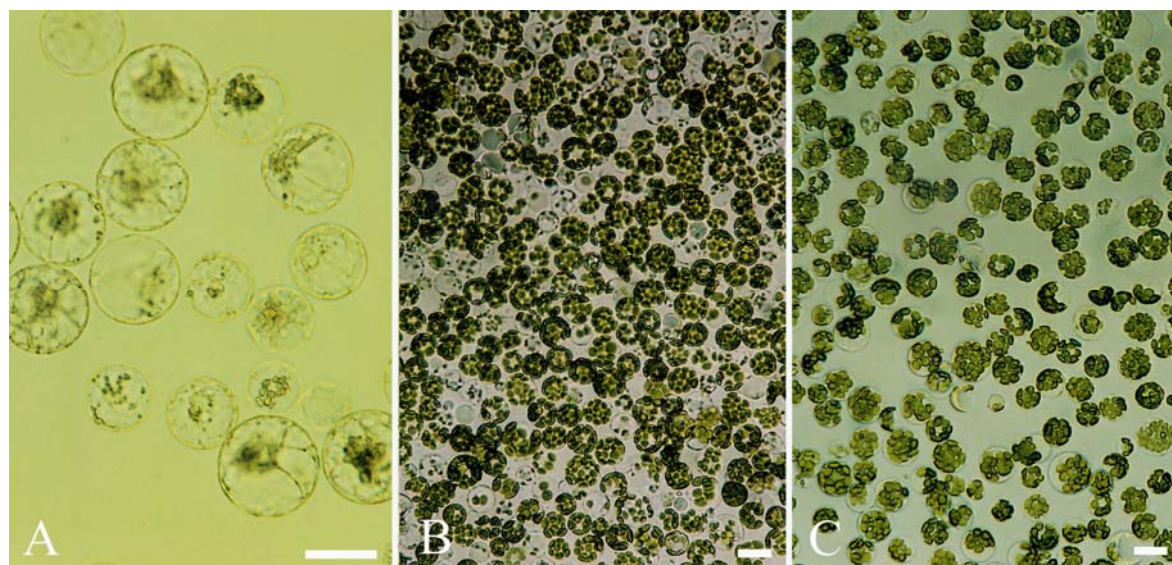


Figura 4.1 Isolamento de protoplastos de calo e de folha. (A) Protoplastos de calo recentemente isolados que exibem um largo intervalo de diâmetros (a barra vale 40 μm). (B) Protoplastos de folha observados logo após o seu isolamento (a barra vale 20 μm). (C) Protoplastos de folha observados após purificação (a barra vale 20 μm).

4.3.1.3 Isolamento de protoplastos de folha de estufa

Em complementaridade com os isolamentos efectuados a partir de folhas *in vitro* foram também realizados ensaios com folhas de estufa. Nos ensaios preliminares foram utilizadas folhas muito jovens de um ulmeiro de campo mas, com esta fonte de material, nunca foi possível obter protoplastos. Este resultado poderá dever-se à presença de uma cutícula mais espessa, em comparação com a das folhas *in vitro*, que dificultou a penetração das enzimas (resultados não divulgados). Posteriormente, utilizaram-se folhas de plantas de estufa que se encontravam em crescimento activo. A partir destas plantas, apenas a folha não expandida do ápice caulinar foi sempre produtiva. Com esta folha, a média dos rendimentos obtidos (Tabela 4.4) esteve muito próxima da atingida com as folhas *in vitro*, usando a combinação com a Cellulase RS. Apesar de na Tabela 4.4 serem apresentados resultados de isolamentos realizados com a segunda folha, esta nem sempre foi produtiva. Estes resultados foram obtidos quando a diferença de condição, em relação à

expansão da folha, era muito ténue. Talvez por isso não se tenham verificado diferenças significativas entre os rendimentos da primeira e da segunda folha, sempre que a mais velha também era produtiva (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Rendimentos obtidos com a 1ª e 2ª folhas de plantas de estufa, em crescimento activo. Os valores representam as médias e os desvios padrão de, pelo menos, dois isolamentos. Os valores seguidos da mesma letra, na mesma linha ou coluna, não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Enzimas % (p/v)	Rendimento (protoplastos / grama peso fresco)	
	Folhas de estufa	
	1ª	2ª
1,0% Cel. Onoz. R10 + 0,25% Mac. Onoz. R10	$3,80 \times 10^6 \pm 2,68 \times 10^6$ a	$3,92 \times 10^5 \pm 4,74 \times 10^4$ a
1,0% Cel. Onoz. RS + 0,25% Mac. Onoz. R10	$2,42 \times 10^7 \pm 1,34 \times 10^7$ a	$1,08 \times 10^6 \pm 4,84 \times 10^5$ a
Cel. Onoz. RS – Cellulase Onozuka® RS; Cel. Onoz. R10 – Cellulase Onozuka® R10; e Mac. Onoz. R10 – Macerozyme Onozuka® R10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co.,Ltd)		

4.3.1.4 Viabilidade dos protoplastos

Os valores de viabilidade, determinados após a etapa de purificação, foram muito heterogéneos, independentemente da fonte de material e da combinação enzimática. A percentagem de protoplastos verde-fluorescente, em presença de fluoresceína diacetato, variou entre [60,7](#) a [80,0%](#), valores que se enquadram nos apresentados por Dorion et al. (1994) para a mesma espécie, que variavam entre 60 e 87%.

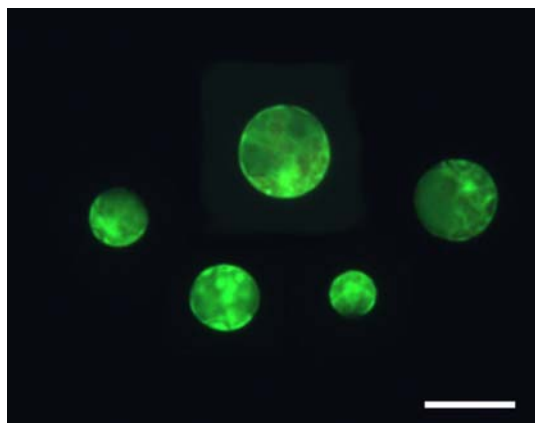


Figura 4.2 Protoplastos de folha, observados sob luz ultra-violeta, que provam a sua viabilidade devido à cor verde-fluorescente que exibem em presença de fluoresceína diacetato (a barra vale 25 μ m).

4.3.2 Cultura de protoplastos de folha

Na cultura de protoplastos de ulmeiro foram usadas folhas de plantas micropropagadas. Várias razões contribuíram para esta escolha: 1) das três fontes de material testadas no isolamento de protoplastos, as folhas *in vitro* forneceram os melhores rendimentos; 2) as folhas *in vitro* podem ser usadas sempre que necessário; 3) com folhas *in vitro* não há necessidade de usar desinfetantes, que podem adicionar substâncias nocivas ao processo de isolamento e cultura; 4) a viabilidade dos protoplastos de folha *in vitro* foi semelhante à das outras fontes.

Das cinco combinações enzimáticas que possuíam a Cellulase Onozuka RS, nenhuma delas apresentou rendimentos significativamente diferentes das restantes, mesmo quando a concentração das enzimas foi aumentada. Segundo Kirby et al. (1989) as enzimas comerciais possuem impurezas como sais, substâncias fenólicas, nucleases e proteases que podem ter um efeito negativo no comportamento dos protoplastos em cultura. Por estas razões, o uso de pequenas quantidades de enzimas é recomendável, porque reduz a exposição às impurezas que podem comprometer o desenvolvimento dos protoplastos. No trabalho realizado, a combinação que obedecia a estas condições era a que possuía 1% de Cellulase Onozuka RS e 0,25% de Macerozyme Onozuka R10.

Para a cultura de protoplastos foram utilizados três diferentes métodos de cultura. A cultura em meio líquido, a cultura em meio líquido sobre meio sólido e a cultura em gotas de agarose (Tabela 4.5).

4.3.2.1 Cultura em meio líquido e em meio líquido sobre meio sólido de agarose

Inicialmente utilizou-se como meio de cultura o meio 8p para protoplastos, da versão original de Kao e Michayluk (1975) (KM8p), empregando o método de cultura em meio líquido (CML) e o método de cultura em meio líquido sobre meio sólido de agarose (CML/MS). Neste primeiro ensaio, a densidade de protoplastos utilizada foi de 3×10^5 pp/ml (Tabela 4.5). Em ambos os métodos de cultura os protoplastos rebentaram por turgescência, três dias após a cultura. Este resultado deveu-se, provavelmente, ao facto do meio de cultura possuir um potencial osmótico superior ao da solução de isolamento (CPW

13M), uma vez que esta continha uma elevada concentração de manitol (13%) que estava ausente no meio de cultura.

Tabela 4.5 Composição dos meios de cultura usados na cultura de protoplastos de folha de *Ulmus minor*, com indicação do método de cultura utilizado e da densidade de protoplastos usada nos vários ensaios efectuados para cada método

	KM8p (Kao e Michayluk 1975)	KM8pmod.1 (modificado de Kao e Michayluk 1975)	KM8pmod.2 (modificado de Kao e Michayluk 1975)	KM8pmod.3 (modificado de Kao e Michayluk 1975)
Sais minerais, vitaminas, ácidos orgânicos e açúcares	KM 8p	KM 8p	KM 8p	KM 8p
Glucose	68,4 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l
Sacarose	0,25 g/l	20,5 g/l	20,5 g/l	20,5 g/l
Manitol	0,25 g/l	109,3 g/l	109,3 g/l	109,3 g/l
MES	5mM	5 mM	5 mM	5 mM
2,4-D	0,2 mg/l	–	0,2 mg/l (2)	0,2 mg/l (3)
Zeatina	0,5 mg/l	–	0,2 mg/l (2)	0,5 mg/l (3)
AAN	1,0 mg/l	3,1 mg/l (1)	0,5 mg/l (2)	1,0 mg/l (3)
BAP	–	1,0 mg/l (1)	–	–
pH	5,7	5,7	5,7	5,7
Tipo de cultura e densidade de protoplastos usada (nºpp/ml)	CML (d=3x10 ⁵) CML/MS(d=3x10 ⁵)	CML (d=1x10 ⁵)	CML (d=1x10 ⁵)	CML/MS(d=1x10 ⁵) CGA (d=1x10 ⁵) CGA (d=2x10 ⁵)

CML-cultura em meio líquido; CML/MS-cultura em meio líquido sobre meio sólido de agarose; CGA-cultura em gotas de agarose

(1) combinação de reguladores de crescimento de Dorion et al. (1994)

(2) combinação de reguladores de crescimento de Sticklen et al. (1986)

(3) combinação de reguladores de crescimento do meio 8p de Kao e Michayluk (1975)

Numa segunda abordagem, e numa tentativa de contrariar este resultado, modificaram-se as concentrações de sacarose e manitol de modo a atingir um potencial osmótico semelhante ao da solução de isolamento (Tabela 4.5). Assim a concentração de sacarose foi elevada para 20,5 g/l e a concentração de manitol para 109,3 g/l. Uma vez que, o somatório destas duas concentrações estava próximo do potencial osmótico pretendido, a quantidade de glucose da composição original do meio KM8p (68,4 g/l) foi reduzida para a

mesma concentração dos restantes açúcares, que era de 0,25 g/l, e o resto dos componentes do meio KM8p foi mantido. O meio base de KM8p, com estas modificações, foi então utilizado em todos os outros ensaios que variaram apenas na combinação de reguladores de crescimento. As combinações de reguladores de crescimento testadas foram a do KM8p original e as de Sticklen et al. (1986) e de Dorion et al. (1994) utilizadas, respectivamente, para a cultura de protoplastos de calo e de folha de *Ulmus* (Tabela 4.5).

Após estas alterações ao meio de cultura, o método de cultura em meio líquido foi mais uma vez ensaiado, usando desta vez uma densidade de protoplastos igual a 1×10^5 pp/ml e as combinações de reguladores de crescimento referidas para o ulmeiro (meios KM8pmod.1 e KM8pmod.2 da Tabela 4.5). Mais uma vez, a divisão de células e a formação de colónias não foram observadas. Os protoplastos apenas intumesceram e formaram agregados (Fig.s 4.3A a 4.3C). Oito dias após a cultura, 61,1% dos protoplastos ainda se mantinham viáveis. Uma semana depois, a presença de grupos de protoplastos agregados foi maior no meio com 3,1 mg/l de ANA e 1,0 mg/l de BAP (KM8pmod. 1 Fig.s 4.3B e 4.3C) do que no meio com 0,2 mg/l de 2,4-D e Zeatina e 0,5 mg/l de ANA (KM8pmod. 2) (40,0% contra 3,4%, respectivamente). Apesar destas diferenças, em nenhum destes meios foram observadas divisões, embora se tenham observado alguns protoplastos deformados que evidenciavam a reconstituição da parede celular (Fig.s 4.3B e 4.3C). Dorion et al. (1994) utilizaram para a cultura em meio líquido de protoplastos de folha, densidades entre $2 - 3 \times 10^5$ pp/ml porque constataram que, neste intervalo, a viabilidade dos protoplastos, após 9 dias, era de 60,0% contra 30,0% em qualquer outra densidade fora daquele intervalo. Embora a viabilidade aqui obtida (61,1%) fosse idêntica à obtida por Dorion et al. (1994), num período semelhante, nas condições aqui testadas a divisão celular nunca foi observada.

Uma vez que usando o método de cultura em meio líquido não houve formação de colónias, o método de cultura em meio líquido sobre meio sólido de agarose, na densidade anteriormente testada, foi novamente ensaiado usando agora o meio KM8pmod.3 que possuía a combinação de reguladores de crescimento do meio KM8p original. No entanto, os resultados observados foram muito semelhantes aos registados com a cultura em meio líquido. Apesar de se observarem alguns protoplastos em deformação, quatro semanas após a cultura não foi observada qualquer divisão.

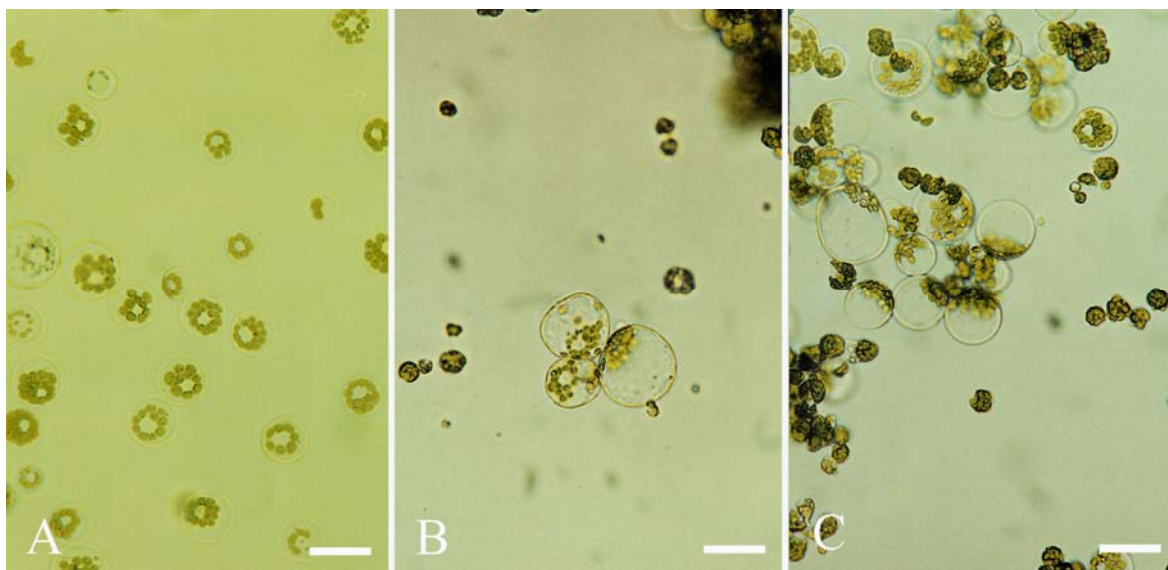


Figura 4.3 Resultados da cultura em meio líquido. (A) Protoplastos intumescidos observados 1 semana após o início da cultura nos meios KM8pmod.1 e KM8pmod.2. (B) e (C) Exemplos de protoplastos agregados e em deformação no meio KM8pmod.1, 2 semanas após o início da cultura; (as barras valem 35 μ m).

4.3.2.2 Cultura de protoplastos em gotas de agarose

Dado que os dois métodos de cultura descritos anteriormente não forneceram resultados positivos, testou-se a utilização de um terceiro método de cultura, a cultura em gotas de agarose (CGA). Com este tipo de cultura foram utilizadas duas densidades de plaqueamento, 1×10^5 e 2×10^5 pp/ml (Tabela 4.5). Onze dias após a cultura, a percentagem de protoplastos não redondos, que mostravam possuir parede celular, era de 21,4% nas gotas com maior densidade de protoplastos e nula nas de menor densidade. Três semanas após a cultura visualizaram-se as primeiras colónias de células (Fig. 4.4H). Às seis semanas, a percentagem de gotas com colónias vistas à lupa (Fig. 4.4C) era de 62,5% para a maior densidade e mais uma vez nula para a menor densidade. Naquele período, as maiores colónias atingiram o tamanho de 120 μ m (Fig. 4.4J). Duas semanas mais tarde, as colónias já atingiam o tamanho de calos muito pequenos (microcalos) que eram visualizados a olho nu (Fig. 4.4A) e a eficiência de plaqueamento (percentagem de microcalos expressos em relação ao número de protoplastos viáveis plaqueados) era de 1,3%. Após dez semanas em cultura, a eficiência de plaqueamento atingiu os 2,7%. Nesta altura os microcalos de maior dimensão possuíam entre 0,5 a 1 mm de diâmetro e podiam ser transferidos para meio sólido (Fig. 4.4D). A seguir a esta transferência, os calos

mostraram alguma fenolização mas, depois disso, continuaram um crescimento normal. Quinze semanas após o início da cultura de protoplastos, o calo proliferado mostrava possuir características semelhantes ao calo embriogénico produzido a partir de folha (Cap. 5). Este calo era nodular (Fig. 4.4F) e apresentava-se constituído por células pequenas redondas e isodiamétricas. Em amostras coradas com carmin acético, o núcleo e o nucléolo das células eram facilmente visíveis e estas eram muito ricas em substâncias de reserva que coravam de azul em presença de soluto de lugol, mostrando ser grãos de amido. Estas são as características comuns ao calo embriogénico que têm sido citadas em numerosos sistemas de embriogénese somática (Yeung 1995).

Dado que este é o primeiro trabalho de cultura de protoplastos de ulmeiro que emprega o método de cultura em gotas de agarose, os resultados obtidos só podem ser comparados com os de Dorion et al. (1994), alcançados com o método de cultura em meio líquido. Este grupo referiu que usando aquele método, quatro meses após a cultura, a melhor eficiência de plaqueamento atingida para um clone de *U. minor* era de 2,2%. Dons e Colijn-Hooymans (1989) referiram que a cultura em agarose apresenta várias vantagens sobre a cultura em meio líquido. Uma dessas vantagens é o incremento da eficiência de plaqueamento devido à imersão dos protoplastos em agarose. Esta poderá ser a explicação para o resultado aqui obtido uma vez que, dois meses e meio após o início da cultura, a eficiência de plaqueamento atingida era já ligeiramente superior (2,7%) à alcançada por Dorion et al. (1994) aos quatro meses (2,2%).

Em relação à densidade de protoplastos a utilizar na cultura, os resultados encontrados para a densidade de 1×10^5 pp/ml parecem estar em conformidade com o descrito por Dorion et al. (1994) para a cultura em meio líquido. Também aqui, aquela densidade, que se encontra fora do intervalo apresentado por aqueles autores como óptimo, ($2 - 3 \times 10^5$ pp/ml), forneceu resultados negativos. Possivelmente, esta poderá ter sido a principal causa de insucesso nos outros métodos uma vez que, exceptuando o primeiro ensaio que foi realizado com o meio KM8p original, em todos os outros foi usada a densidade de 1×10^5 pp/ml. Presumivelmente, nesta menor densidade a concentração de factores de crescimento, produzidos pelos próprios protoplastos, foi insuficiente para desencadear a formação de colónias. Em estudos posteriores, seria então aconselhável testar novamente aqueles métodos de cultura usando densidades de protoplastos superiores à usada.

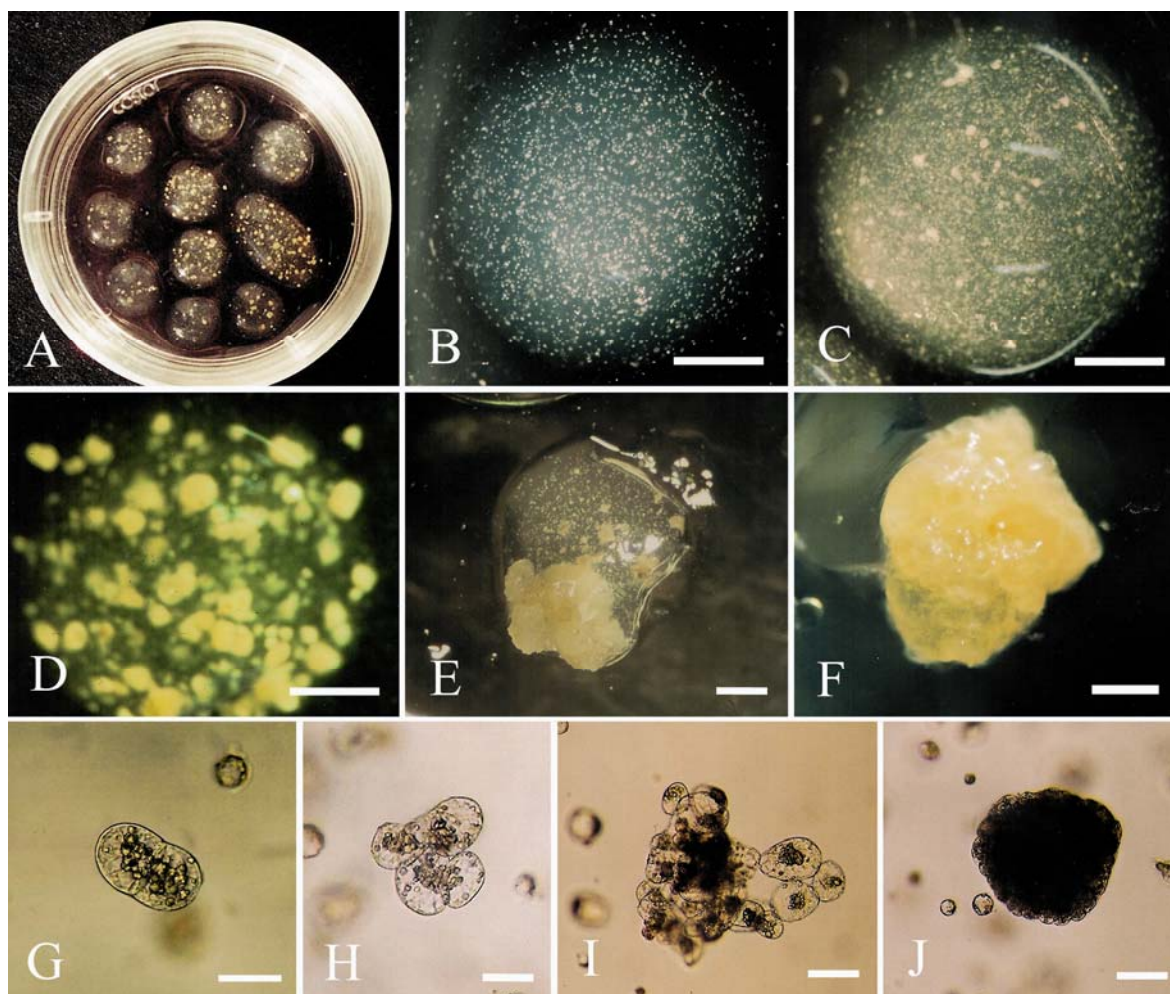


Figura 4.4 Cultura de protoplastos de mesófilo em gotas de agarose. (A) Placa de petri de 35x10 mm, do tipo das usadas nesta cultura, contendo 11 gotas de agarose. B – F Observação da formação de microcalos à lupa. (B) Gota de agarose com protoplastos, observada à lupa logo após o seu endurecimento. (C) Gota de agarose com grandes colônias, formadas 6 semanas após a cultura. (D) Gota de agarose com microcalos observados antes da transferência para meio sólido, às 10 semanas após a cultura; (as barras em B, C e D valem 1,5 mm). (E) Pequeno calo em proliferação três semanas após a sua transferência para meio sólido de embriogênese (a barra vale 1 mm). (F) Pequeno calo mantido no meio de embriogênese durante cinco semanas que mostra possuir as características típicas de um calo embriogénico (a barra vale 0,5 mm). G – J Observação, no microscópio invertido, da divisão das células e consecutiva formação de colônias. (G) Célula em divisão observada 2 semanas após a cultura. (H) Colônia com cerca de 6 células observada às 3 semanas. (I) Colônia com mais de 10 células observada às 4 semanas. (J) Colônia com cerca de 120 µm de diâmetro, observada 6 semanas após o início da cultura; (as barras em G – J valem 40 µm).

Dorion et al. (1994) regeneraram um pequeno número de plantas a partir de protoplastos de folha de ulmeiro. Este grupo referiu que a regeneração de plantas foi o maior obstáculo deste processo, porque a frequência de indução de rebentos foi muito baixa e o alongamento frequentemente inibido. Dado o excelente resultado de regeneração de plantas em calo embriogénico proveniente de folha (Cap. 5; Conde et al. 2004) pode-se assumir que, se em estudos posteriores o calo embriogénico derivado de protoplastos se

comportar desta forma, a obtenção de plantas via embriogénese permitirá ultrapassar as dificuldades encontrados na produção de plantas por organogénese indirecta.

4.4 Conclusão

Neste capítulo foram desenvolvidos protocolos de isolamento de protoplastos de calo e de folhas de ulmeiro, protocolos esses que permitiram a obtenção de bons rendimentos. Das três fontes de material que foram testadas, as folhas *in vitro* forneceram os rendimentos mais elevados. Usando a Cellulase Onozuka RS, o rendimento numa das combinações atingiu uma média de 3.96×10^7 protoplastos/g p.f. Em relação às plantas de estufa, a idade da folha foi crucial para a obtenção de uma boa produção de protoplastos.

Neste trabalho, provou-se que o isolamento de protoplastos a partir de folha de ulmeiro é possível sem a utilização de enzimas de elevado custo, contrariamente ao referido anteriormente para a espécie.

O protocolo de cultura foi optimizado usando protoplastos de folha *in vitro*. Esta escolha deveu-se ao facto de este material não necessitar de desinfecção e de estar sempre apto para utilização. No entanto, este protocolo poderá ser igualmente testado com as outras fontes, tendo em conta os bons resultados de isolamento.

Em relação à cultura de protoplastos, provou-se a necessidade de utilização de um meio com potencial osmótico semelhante ao utilizado na solução de isolamento (CPW 13M), uma vez que num meio com maior potencial osmótico os protoplastos romperam por turgescência. Com esta alteração, o meio KM8p de Kao e Michayluk (1975) mostrou-se um bom meio de cultura, sendo a primeira vez que este meio foi utilizado na cultura de protoplastos de folha de *U. minor*.

Dos três métodos de cultura que foram utilizados, apenas o método de cultura em gotas de agarose fomentou a produção de microcalos. O método de cultura em gotas de agarose foi pela primeira vez usado para o ulmeiro. O sucesso aqui obtido com este método é muito promissor, uma vez que este tipo de cultura possui algumas vantagens em relação à cultura em meio líquido: 1) neste método, os protoplastos estão imersos na agarose e por isso permanecem numa posição fixa o que facilita o seu seguimento e estudo; 2) os protoplastos não se podem agregar, como na cultura em meio líquido, e podem ser

plaqueados em baixas densidades de forma a separar os microcalos formados facilitando a clonagem; 3) o meio de cultura pode ser facilmente trocado e substituído por um meio selectivo, quando se pretende seleccionar os protoplastos transformados (Bajaj 1989).

A cultura em gotas de agarose e a utilização do meio enriquecido de Kao e Michayluk (1975) foram, provavelmente, os principais promotores de uma eficiência de plaqueamento superior à anteriormente referida para a espécie.

Em relação ao ulmeiro, o desenvolvimento de protocolos detalhados de manipulação de protoplastos é uma extraordinária mais valia, uma vez que estes poderão ser testados noutras espécies, incitando assim a aplicação dos protoplastos na obtenção de ulmeiros resistentes.

Referências bibliográficas

- Anthony P, Otoni W, Power JB, Lowe KC, Davey MR (1999)** Protoplast isolation, culture and plant regeneration from *Passiflora*. In: Hall RD (ed.) *Methods in Molecular Biology* vol. 111, *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 169-181
- Bajaj YPS (1989)** Recent advances in the isolation and culture of protoplasts and their implications in crop improvement. In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 8, *Plant Protoplasts and Genetic Engineering I*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3-22
- Conde P, Loureiro J, Santos C (2004)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Rep* 22(9): 632-639
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC (2005)** Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23: 131-171
- [Domir SC, Sticklen MB, Pijut PM, Bolyard MG, Lineberger RD \(1993\) Micropropagation and regeneration of DED-resistant elms using protoplast and tissue culture techniques. In: Sticklen MB and Sherald JM \(ed.s\) Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. Springer-Verlag, New York, pp: 81-88](#)**
- Dons JJM, Colijn-Hooymans (1989)** Agarose plating of protoplasts and its applications. In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 8, *Plant Protoplasts and Genetic Engineering I*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 50-62
- Dorion N, Ben Jouira H, Danthu P, Bigot C (1994)** Regeneration of plants from protoplasts of *Ulmus* species (elms). In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 29, *Plant Protoplasts and Genetic Engineering V*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 172-190

- Dorion N, Godin B, Bigot C (1983)** Isolation and culture of leaf protoplasts from *Ulmus* sp., preliminary report. In: Potrykus I Harms CT Hinnen A (eds.). 6th International Protoplast Symposium, Poster Proc., Birkhauser, Basel, pp. 8-9
- Gartland JS, McHugh AT, Brasier CM, Irvine RJ, Fenning TM, Gartland KMA (2000)** Regeneration of phenotypically normal English elm (*Ulmus procera*) plantlets following transformation with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. Tree Physiology 20: 901-907
- Gartland KMA, McHugh AT, Crow RM, Garg A, Gartland JS (2005)** 2004 SIVB congress symposium proceeding: biotechnological progress in dealing with dutch elm disease. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant 41: 364-367
- Ishii S (1989)** Enzymes for the isolation of protoplasts. In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 23-33
- Kao KN Michayluk MR (1975)** Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126: 105-110
- Kirby EG, Campbell MA, Penchel RM (1989)** Isolation and culture of protoplasts of forest trees species. In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 8, Plant Protoplasts and Genetic Engineering I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 262-27
- Power JB, Chapman JV (1985)** Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. In: Dixon RA (ed.) Plant Cell Culture – a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington DC. pp. 37-66
- Redenbaugh MK, Karnosky DF, Westfall RD (1981)** Protoplast isolation and fusion in three *Ulmus* species. Canadian Journal of Botany 59: 1436-1443
- Redenbaugh MK, Westfall RD, Karnosky DF (1980)** Protoplast isolation from *U. americana* L. pollen mother cells, tetrads and microspores. Canadian Journal of Forestry Research 10: 284-289.
- Smalley EB, Guries RP (2000)** Asian elms: sources of disease and insect resistance. In: Dunn CP (ed.) The Elms, Breeding, Conservation and Disease Management. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 215-230
- Sticklen MB, Domir SC, Lineberger RD (1986)** Shoot regeneration from protoplasts of *Ulmus* x ‘Pioneer’. Plant Science 47: 29-34
- Sticklen MB, Hajela RK, Bolyard MG, Graham LS, Sherald JL (1994)** Genetic transformation in *Ulmus* species (elms). In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 29, Plant Protoplasts and Genetic Engineering V. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 401-410
- Sticklen MB, Lineberger RD, Domir SC (1985)** Isolation and culture of protoplasts of *Ulmus* x ‘Homestead’. Plant Science 41: 117-120

Yeung EC (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 205-247

Capítulo 5

Embriogénese somática em folhas de *Ulmus minor* Mill.

Parte do trabalho apresentado neste capítulo foi publicado em:

Conde P, Loureiro J, Santos C (2004) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. Plant Cell Reports 22: 632-639

5 Embriogénese somática em folhas de *Ulmus minor* Mill.

Sumário

Este capítulo reporta o primeiro sistema de regeneração de embriões somáticos de ulmeiro a partir de um indivíduo adulto.

Numa primeira fase, foi induzido calo embriogénico em folhas de rebentos propagados *in vitro*, cultivadas em oito meios baseados no meio MS (Murashige e Skoog 1962), que diferiam na composição dos reguladores de crescimento. A idade dos rebentos, usados nestes ensaios, foi um dos factores testados na indução de embriogénese somática. A produção de calo embriogénico foi registada em dois dos meios que foram ensaiados (I2 e I6). A partir do calo embriogénico, mantido no meio de indução I6, foram obtidos embriões somáticos em fase globular. Apesar de oito diferentes meios terem sido testados no sentido de histodiferenciar aqueles embriões, este objectivo não foi atingido.

Numa segunda fase deste trabalho, o calo embriogénico obtido no meio de indução I6 foi transferido para MS basal e, neste, obtiveram-se embriões precocemente germinados. Uma média de 35,9% destes embriões converteram-se em plantas em meio de conversão com apenas 1% de sacarose. A percentagem de aclimatização destas plantas atingiu o valor de 39,7% e este valor não foi significativamente diferente do encontrado para um grupo controlo. Não foram observadas diferenças morfológicas entre as plantas derivadas dos embriões somáticos e o grupo controlo.

A cultura dos embriões precocemente germinados em meio basal de MS promoveu a formação de novos embriões por embriogénese repetitiva. Este fenómeno foi desencadeado tanto por via directa, como pela produção de calo embriogénico formado *de novo*. Foi a partir dos embriões, produzidos via embriogénese repetitiva, que as diferentes fases da ontogénese dos embriões somáticos de ulmeiro foram visualizadas. Os embriões secundários foram convertidos em plantas que se mostraram semelhantes às obtidas dos embriões precocemente germinados.

5.1 Introdução

5.1.1 Embriogénese somática

De entre os vários sistemas de cultura *in vitro* vigentes, a embriogénese somática exhibe especial destaque e tem sofrido um enorme incremento nos últimos anos, principalmente com espécies florestais (Merkle e Nairn 2005). Esta oferece a oportunidade de produzir, numa única etapa, plantas bipolares de características relevantes e, por outro lado, permite a regeneração de plantas geneticamente modificadas, tanto por transformação genética como por hibridização somática (Gaj 2004; Giri et al. 2004). A embriogénese somática é definida como uma via de desenvolvimento através da qual células somáticas evoluem em estruturas bipolares, que se assemelham a embriões zigóticos, que não possuem ligações vasculares com o tecido parental (Jiménez 2005).

Para melhor entender a embriogénese somática os botânicos adoptaram os termos competência, indução e determinação. A competência é a capacidade de resposta a estímulos exteriores de células, tecidos ou órgãos. A indução ocorre quando um sinal induz uma resposta única a partir do tecido competente. A determinação é o processo pelo qual o destino de uma célula, ou de um grupo de células, se torna definido e dirigido numa determinada via de desenvolvimento (Yeung 1995).

Fehér et al. (2003) afirmaram, recentemente, que durante a aquisição de competência embriogénica as células têm de activar o seu ciclo de divisão e têm de reorganizar o seu padrão fisiológico, metabólico e de expressão de genes. Vários factores podem influenciar a aquisição de competência no processo embriogénico. Gaj (2004) referiu que o tipo de explante e o seu estado de desenvolvimento parecem ser os factores mais importantes que determinam a capacidade embriogénica da cultura. Para além destes, outros factores como a adição de reguladores de crescimento e a sujeição a condições de stresse, têm sido largamente referidos como impulsionadores do processo embriogénico (Fehér et al. 2003; Gaj 2004). A fase final deste processo leva então à formação de células que se tornam determinadas na via embriogénica (Yeung 1995).

Dois padrões básicos de indução de embriogénese somática são reconhecidos: a embriogénese directa e indirecta. Yeung (1995) defende que a forma de definir “directa” ou “indirecta” parece ter mais significado quando se refere ao estado epigenético das

células do explante. Sendo assim, nas células que retiveram algumas das propriedades das células meristemáticas parentais de que são derivadas (como, por exemplo, nos embriões zigóticos) é mais fácil induzir a embriogénese somática do que em explantes mais maduros. Células mais diferenciadas parecem necessitar de maiores mudanças epigenéticas tornando o processo de embriogénese somática menos directo. Sendo assim, Yeung (1995) sustenta que a mais importante distinção entre embriogénese directa e indirecta deve ser feita em relação ao período necessário para adquirir competência. Na embriogénese directa as células respondem às condições de experimentação e tornam-se determinadas num período de tempo mais curto. Na embriogénese indirecta é necessário um período de tempo mais longo para atingir o estado embriogénico, sendo este, frequentemente, precedido de uma proliferação desorganizada das células.

Uma vez determinadas para a embriogénese, não existem diferenças fundamentais de comportamento entre as células pré-determinadas e aquelas em que o estado embriogénico foi induzido *in vitro*, sendo ambas referidas como células embriogénicas (Williams e Maheswaran 1986). Em todos os sistemas, as células embriogénicas mostram um número de características comuns que são próprias de células meristemáticas. Estas incluem pequeno tamanho, conteúdo citoplasmático denso, grandes núcleos com nucléolos proeminentes, pequenos vacúolos e muitos grãos de amido (Maheswaran e Williams 1985).

5.1.2 Factores que influenciam a embriogénese somática em lenhosas

No decurso deste trabalho experimental não existia qualquer publicação relativa ao processo de embriogénese somática no género *Ulmus*. Por esta razão, houve neste capítulo um empenhamento acrescido no desenvolvimento de um protocolo fiável de regeneração de plantas por esta via. A secção que a seguir se apresenta foi elaborada de forma a melhor compreender os mecanismos que desencadeiam este processo permitindo assim o estabelecimento desse protocolo. Nesta secção, o levantamento efectuado incidiu, principalmente, sobre trabalhos de embriogénese somática em lenhosas. À data de execução desta tese não foram encontrados trabalhos deste tipo nem mesmo para os géneros das famílias da ordem Urticales, à qual pertence o ulmeiro (Hutchinson 1973).

Para além disso, a ordem Urticales possui um reduzido grupo de famílias que, em termos evolutivos, não apresenta afinidade com outras ordens (Hutchinson 1973).

5.1.2.1 Explante

A embriogénese somática pode ser induzida em cultura usando vários tipos de explante. Gaj et al. (2004) referiram os seguintes explantes como tendo sido usados em 124 publicações recentes de embriogénese somática: plântulas e suas partes, folhas, raízes, rebentos, sementes, flores e embriões zigóticos, entre outros. Num artigo de revisão de Raemakers et al. (1995), sobre trabalhos de embriogénese somática de 200 espécies, os autores dividiram os explantes usados na indução de embriogénese somática em três grandes grupos: embriões zigóticos (e partes destes, incluindo partes de plântulas) explantes florais e explantes vegetativos (folhas, pecíolos, ápices caulinares e segmentos nodais). Dunstan et al. (1995) efectuaram uma revisão em que, entre outros parâmetros, indicaram os diferentes tipos de explante usados em 218 publicações de embriogénese somática de 116 espécies angiospérmicas, lenhosas. Tendo em conta esta revisão, e a organização dos explantes, acima enunciada, obteve-se a seguinte quantificação artificial dos tipos de explante utilizados naqueles trabalhos: embriões zigóticos - 45,7%; explantes florais - 19,7%; explantes vegetativos - 26,0%; outros tipos de explante - 8,7% (calo, suspensões celulares, protoplastos de suspensões embriogénicas, etc.). Pelos valores acima indicados pode-se verificar que apenas em 26% das espécies os explantes são de origem vegetativa, sendo na maior parte dos casos usados explantes provenientes de embriões zigóticos. Toribio et al. (2004) referem que, no caso do carvalho (*Quercus robur*), a indução de embriogénese somática a partir de embriões zigóticos funciona como uma limitação do processo uma vez que não se conhecem as características do material assim propagado. Por esta razão, a obtenção de tecidos embriogénicos a partir de explantes vegetativos concede uma excelente oportunidade de propagar árvores de manifesta superioridade genética (Minocha e Minocha 1995). A partir dos outros grupos de explantes, o genótipo obtido só poderá ser avaliado, posteriormente, pela observação do fenótipo das plantas. Nos sistemas de embriogénese somática em que são empregues explantes daqueles grupos há a necessidade de desenvolver métodos de conservação dos

embriões até que a sua avaliação clonal possa ser realizada, como no caso de *Picea abies* (von Arnold et al. 2005), o que acarreta um maior investimento e mão de obra. Por estas razões, a implementação de sistemas de embriogénese somática a partir de indivíduos maduros é um objectivo a atingir para grande parte das espécies.

Embora em espécies que possuem crescimento vegetativo jovem, em indivíduos maduros, seja relativamente fácil obter explantes vegetativos, o período de colheita é limitado e o material apresenta geralmente grandes taxas de infecção. Por estes motivos, uma forma de disponibilidade constante de material livre de infecção é através da propagação de gemas em cultura *in vitro*. A cultura *in vitro* fornece assim a possibilidade de controlar este, e outros factores, que poderão ser importantes na promoção de sistemas de embriogénese somática.

5.1.2.2 Reguladores de crescimento

Vários são os reguladores de crescimento que têm sido usados na indução de embriogénese somática e o seu envolvimento neste processo ainda não está completamente compreendido (Jiménez 2005). Gaj (2004) referiu, no seu artigo de revisão em que foram revistos 124 protocolos de embriogénese somática, que apenas em 7% dos casos a regeneração de plantas por esta via foi conseguida sem o auxílio de reguladores de crescimento. Em mais de 80% dos protocolos, a embriogénese foi induzida na presença isolada de auxinas ou em combinação com citocininas. Entre as diferentes auxinas, o 2,4-D foi o mais comumente utilizado sendo citado, sózinho ou em combinação com outros reguladores de crescimento, em mais de 65% dos protocolos. Raemakers et al. (1995) referiram o seguinte em relação aos reguladores de crescimento utilizados, tendo em conta o tipo de explante. Os embriões zigóticos e os explantes florais iniciam embriões somáticos em meios que, na maior parte dos casos, são suplementados com citocininas. Por outro lado estes fitoreguladores são muito pouco citados para explantes vegetativos onde as auxinas e a razão auxina/citocinina são usadas com maior frequência.

A escolha dos reguladores de crescimento utilizados nos ensaios de indução de embriogénese somática em *Ulmus minor* teve como base uma pesquisa efectuada numa revisão de Dunstan et al. (1995) de embriogénese somática em lenhosas. Para isso, fez-se

um levantamento dos reguladores de crescimento, e respectivas concentrações, mais utilizados com sucesso em angiospérmicas dicotiledóneas, lenhosas, dando prioridade às combinações em que foram utilizadas folhas como explante. Concluiu-se desta forma que a razão auxina/citocinina era a mais utilizada sendo as duplas mais citadas 2,4-D/Kn e 2,4-D/BAP.

5.1.2.3 Meio e outras condições de cultura

A formulação que tem sido usada, mais extensamente, nos trabalhos de embriogénese somática tem sido a de Murashige e Skoog (1962) (Dunstan et al. 1995; Giri et al. 2004). O seu uso, junto com o uso de outros meios seus derivados, representa mais de 180 exemplos de embriogénese somática com espécies lenhosas. No entanto, algumas espécies ou géneros parecem necessitar de meios de cultura muito característicos (Dunstan et al. 1995).

Vários compostos do meio de cultura têm sido enunciados como intervenientes no processo de embriogénese somática. Exemplos deste tipo são: o tipo e a concentração da fonte de carbono (sendo a sacarose usada com mais frequência); a adição de azoto inorgânico na forma de nitrato ou de amónia; a adição de azoto orgânico na forma de aminoácidos (prolina, serina, glutamina e caseína hidrolisada, etc.) (Merkle et al. 1995). Embora com lenhosas a influência deste tipo de factores ainda não tenha sido exaustivamente tratada existem, no entanto, trabalhos em que estes e outros factores foram testados na melhoria das condições de indução. Um primeiro exemplo é o trabalho de indução de embriogénese em raízes de espécies do género *Prunus* em que foi estudada a influência de: 1) diferentes fontes de carbono; 2) cada um dos macroelementos do meio de cultura e 3) dos complexos de vitaminas de vários meios de cultura (Druart 1999). Outro exemplo é o trabalho de Canhoto (1994) em que foi estudado o efeito de diferentes fontes de carbono e de fornecedores orgânicos e inorgânicos de azoto, em diferentes concentrações, na embriogénese somática de feijoa (*Feijoa sellowiana*). Para além da composição do meio seleccionado para a indução de embriogénese somática, outras condições de cultura como, por exemplo, as que estão relacionadas com a intensidade, o espectro e a duração do período de fornecimento de luz têm sido referidas como

intervenientes neste processo (Gaj 2004). Gaj (2004) referiu que em 119 publicações de produção de embriões somáticos, houve necessidade de uma absoluta ausência de luz em 44% dos casos e houve necessidade de um fotoperíodo em 49% de outros casos. Frequentemente, verifica-se uma outra situação em que existe um período inicial de indução que decorre no escuro e, posteriormente, as culturas são transferidas para a luz (Dunstan et al. 1995). A indução de embriões somáticos em folhas de carvalho (*Quercus robur*) é um exemplo deste tipo de situação (Toribio et al. 2004).

Muitas vezes, a determinação das condições de cultura, durante a indução, resulta da intuição do operador e das instalações que tem disponíveis.

5.1.3 Histodiferenciação, maturação, germinação e conversão

A seguir à expressão, o embrião somático prossegue o seu desenvolvimento passando por várias fases que poderão ser muito semelhantes às observadas com os embriões zigóticos. O processo de formação de órgãos através do qual um embrião em estado globular se desenvolve num embrião em estado cotilédonar tem sido designado por histodiferenciação (Merkle et al. 1995).

Assim como para a indução, vários factores podem afectar a histodiferenciação dos embriões somáticos. Um desses factores é, mais uma vez, a adição de reguladores de crescimento. Enquanto a exposição a uma auxina é geralmente essencial durante a indução do estado embrionário, a exposição contínua a esta é geralmente prejudicial para a sua diferenciação. No entanto, existem exemplos de continuada diferenciação no meio de indução e outros que referem que a aplicação de baixos níveis de auxina exógena pode ser benéfica. Em relação às citocininas, a adição de baixos níveis destas, junto com a redução da quantidade de auxinas, tem sido descrita como benéfica (Jiménez 2005).

Os outros factores que podem influenciar a diferenciação dos embriões são: 1) a sujeição a stresse osmótico, que foi referida como um factor impulsionador do desenvolvimento de embriões em estado globular; 2) a inclusão de ABA, que tem sido apontada como promotora da normal morfologia dos embriões somáticos; 3) a inclusão de carvão activado no meio de cultura, que tem sido citada em sistemas que necessitam de um ambiente isento de auxina, uma vez que este adsorve as auxinas libertadas pelos tecidos,

levando assim à obtenção de embriões de normal morfologia e com capacidade de germinação (Merkle et al. 1995).

Outra fase importante no desenvolvimento do embrião somático é a fase de maturação. Durante esta fase os embriões passam por várias modificações morfológicas e bioquímicas que se manifestam pela expansão celular e pela acumulação de substâncias de reserva (Jiménez 2005).

Em muitas espécies de angiospérmicas lenhosas os embriões maturam em condições de cultura rotineiras (Dunstan et al. 1995). No entanto, tem sido reconhecido que, por vezes, é necessário alterar a composição do meio para que se verifique uma boa maturação do embrião (Sita 1999).

Raemakers et al. (1995) referem que a consequência de uma maturação insuficiente é o desenvolvimento de embriões somáticos com malformação e/ou a formação de folhas “carnudas” com caules fasciculados. Este fenómeno tem sido designado por vários autores como germinação precoce (Ammirato 1988; Vasil e Vasil 1981). Na germinação precoce o embrião em desenvolvimento tem tendência para saltar as fases da embriogénese e adquirir as características de uma plântula defeituosa (Raemakers et al. 1995).

Embora a ocorrência de germinação precoce seja relatada em várias publicações, com frequência, os autores não referem em pormenor as características morfológicas desse tipo de embrião e/ou se foram obtidas plantas a partir destes. Nestas condições, estão por exemplo os trabalhos de Chen et al. (1991) com papaia (*Carica papaya*) e de Arrillaga et al. (1994) com *Robinia pseudoacacia*. Num outro caso, como na publicação de Jayasankar et al. (1999), os autores referem que embriões de videira (*Vitis vinifera*), cultivados em meio líquido, germinavam precocemente mas continuavam o seu crescimento quando transferidos para meio semi-sólido. Um trabalho em que o fenómeno da germinação precoce está bem descrito e explicado é o de Vieitz (1995) em camélia (*Camellia japonica*). Neste sistema de embriogénese somática foram descritos dois tipos de embriões, morfológicamente distintos, que são designados como embriões semelhantes aos de semente (“seed-like”) e embriões semelhantes a rebentos (“bud-like”). Os primeiros eram brancos ou amarelados e com grandes cotilédones, sendo muito semelhantes aos embriões zigóticos maduros. Os segundos eram verdes com cotilédones que pareciam folhas verdadeiras e possuíam uma maior capacidade de produção de plantas que os outros

embriões. Citando Ammirato (1985) a autora apresenta uma explicação para este resultado. Segundo Ammirato (1985), a germinação precoce ocorre quando determinados níveis de citocininas inibem parcial ou totalmente o desenvolvimento dos cotilédones do embrião somático, permitindo assim que o ápice caulinar cresça e se formem as primeiras folhas, fazendo com que o embrião somático se pareça mais com um rebento (Vieitz 1995).

Nas gimnospérmicas, a ocorrência de germinação precoce é frequentemente citada e a adição de ABA e de osmóticos (como por exemplo, sacarose, manitol e PEG) tem sido usada na maturação de coníferas desde há largos anos (Roberts et al. 1990; Tautorus et al. 1991). O aumento da osmolaridade dos meios de maturação, em combinação com baixas concentrações de ABA, tem sido mostrado como sendo um tratamento efectivo na inibição do esverdeamento e germinação precoce de embriões somáticos de coníferas, permitindo assim a obtenção de embriões somáticos de boa qualidade (Attree et al. 1991). Estes dois factores promovem a acumulação de substâncias de reserva (proteínas, lípidos e hidratos de carbono) permitindo a contínua expressão do programa de maturação (Merkle et al. 1995).

Este tipo de procedimentos imitam o que se passa na semente. Numa revisão sobre os mecanismos de acção do ABA endógeno, Hetherington e Quatrano (1991) referiram que, em grande número de espécies, o nível de ABA aumenta nas fases intermédias da embriogénese zigótica, prevenindo a germinação precoce e permitindo a aquisição de tolerância à dessecação pelo embrião zigótico.

Para Merkle et al. (1995) a germinação refere-se ao desenvolvimento da raiz e/ou do ápice caulinar e a conversão é definida como a sobrevivência e desenvolvimento dos embriões germinados no solo. No entanto, grande parte dos autores usa o termo conversão quando são obtidas plantas a partir dos embriões somáticos germinados e mantidos *in vitro* (e.g. Fernández-Guijarro et al. 1995; Cuenca et al. 1999).

Frequentemente são referidas baixas taxas de germinação e conversão dos embriões somáticos em plantas (Jiménez 2005). Em algumas espécies, é necessário sujeitar os embriões a um período de frio para que a frequência de germinação seja amplificada, como é o caso do sobreiro (*Quercus suber*) (Pinto 2002) e do castanheiro Americano (*Castanea dentata*) (Andrade e Merkle 2005). Noutras situações, é necessário sujeitar os embriões a processos de dessecação ou então é necessária a adição de reguladores de crescimento (GA₃, AIB ou citocininas) ou de ABA e/ou de osmóticos (Gaj 2004; Jiménez 2005).

A germinação ocorre, geralmente, em meio de cultura com concentração de sais inferior à da força total e com uma fonte de carbono de concentração também reduzida. Finalmente, durante a fase de aclimatização, um dos factores a ter em conta é o da protecção das plantas das elevadas perdas de água por transpiração, de forma a aumentar as taxas de conversão (Merkle et al. 1995).

5.1.4 Embriogénese repetitiva

Um dos aspectos mais importantes da embriogénese somática para aplicações de propagação em larga escala é a capacidade das culturas embriogénicas proliferarem indefinidamente. Esta capacidade tem sido aproveitada para a utilização industrial em bioreactores, uma vez que a embriogénese somática apresenta diversas vantagens para este efeito, relativamente à organogénese (Ibaraki e Kurata 2001).

Este processo proliferativo tem sido designado como embriogénese secundária, recorrente ou repetitiva (Raemakers et al. 1995). Este tipo de proliferação assume várias formas e é aparentemente influenciado por uma série de factores, muitos dos quais também estão envolvidos na indução da embriogénese primária (reguladores de crescimento, espécie e genótipo). No entanto, na embriogénese repetitiva estes factores não determinam apenas se uma determinada cultura irá perpetuar o seu estado embriogénico mas, também, influenciam as características do ciclo repetitivo. Estes factores parecem ser responsáveis pelo controlo do estado de desenvolvimento a partir do qual a proliferação de novo material embriogénico é accionado e do local do embrião primário onde são produzidos os embriões repetitivos (Merkle et al. 1995).

Geralmente, o factor mais importante associado a esta contínua proliferação é a auxina. Na maior parte dos sistemas de embriogénese somática a presença contínua da auxina inibe o posterior desenvolvimento e maturação dos embriões, mas, se o nível de auxina o permitir, um novo ciclo de embriões é iniciado a partir dos embriões primários. Os níveis de auxina, ou de outros reguladores de crescimento, que promovem esta via variam, no entanto, de espécie para espécie (Jiménez 2005).

Na revisão de Raemakers et al. (1995) sobre embriogénese secundária, os autores referem que, em espécies angiospérmicas dicotiledóneas, os ciclos de embriogénese

repetitiva podem ser iniciados a partir de embriões primários, desde o estado globular até estados maduros e que existem espécies em que este processo pode ser iniciado mesmo a partir de plantas obtidas da germinação dos embriões somáticos. Em termos de reguladores de crescimento, todas as espécies daquele estudo, em que a embriogénese primária foi conseguida sem a adição de fitoreguladores, também não necessitam destes no estabelecimento de ciclos de embriogénese repetitiva. Em 83% das espécies, com embriogénese primária induzida por citocininas, a embriogénese repetitiva não necessita de fitoreguladores. Nos grupos induzidos em presença de auxina e de auxina/citocinina as percentagens de espécies que não necessitam de reguladores de crescimento, nos ciclos de embriogénese repetitiva, são, respectivamente, 31% e 23%.

Em muitos trabalhos de embriogénese somática, a obtenção de embriões secundários surge como um obstáculo à conversão em plantas como é, por exemplo, o caso do sobreiro (*Quercus suber*) (Pinto 2002). Apesar disso, a obtenção de ciclos repetidos de novos embriões permite aumentar em larga escala o número de embriões somáticos e desencadeia uma melhor eficiência da embriogénese secundária relativamente à primária. A produção de embriões secundários surge, mais uma vez, tanto por via directa como por via indirecta e, frequentemente, as culturas mantêm, por vários anos, a sua competência para a embriogénese repetitiva (Gaj 2004).

5.1.5 Objectivos

Anteriormente já foi referido que, neste capítulo, houve um empenhamento acrescido no desenvolvimento de um protocolo fiável de produção de plantas via embriogénese somática. Visando a proliferação e a melhoria do ulmeiro interessava estabelecer um protocolo eficiente de regeneração de embriões a partir de material somático que, posteriormente, poderia ser testado noutros genótipos ou espécies de *Ulmus*. Definiu-se assim um protocolo que foi iniciado a partir de folhas *in vitro*, devido à disponibilidade constante desta fonte de material.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Produção de embriões globulares em calo embriogénico

5.2.1.1 Indução de calo embriogénico

a) fonte de material: Como fonte de material usaram-se folhas de plantas mantidas *in vitro*, durante dois anos, no meio DKW1 (Cap. 2). Estas plantas foram inicialmente estabelecidas a partir de segmentos nodais da árvore F14, seleccionada na Mata Nacional do Choupal, em Coimbra.

b) efeito da idade dos rebentos: Com vista a determinar se o tempo de permanência dos rebentos no meio de cultura influenciaria a competência embriogénica das folhas, dois tipos de rebentos foram utilizados neste ensaio. Rebentos com a última subcultura para o meio de micropropagação realizada 8 semanas antes da colocação das folhas nos meios de indução de embriogénese somática (rebentos novos) e rebentos que não foram submetidos a esta subcultura e portanto permaneceram no mesmo meio de micropropagação durante 16 semanas (rebentos velhos).

c) efeito da composição hormonal dos meios de indução: Os meios de indução de embriogénese somática tinham na sua composição os sais e vitaminas do meio MS (Murashige e Skoog 1962) com 3% (p/v) de sacarose e 0,7% (p/v) de agar purificado, sendo suplementados com 200 mg/l de caseína hidrolisada e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (Tabela 5.1).

Os reguladores de crescimento empregues neste ensaio foram o 2,4-D como auxina e a cinetina (Kn) como citocinina. O 2,4-D foi usado em quatro concentrações diferentes (2,3; 4,6; 9,0 e 18,6 μM) isoladamente e, no caso das três primeiras, também na presença de 1,1 μM de Kn (Tabela 5.1).

d) condições do protocolo base de inoculação (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. escuro):

Para este estudo, usaram-se na totalidade 24 folhas de rebentos novos e 24 folhas de rebentos velhos, por cada combinação de reguladores de crescimento, sendo o procedimento realizado em dois anos consecutivos, na mesma época.

Nas primeiras três folhas, totalmente expandidas, mais próximas do ápice caulinar, foram efectuados 2 a 3 cortes, perpendiculares à nervura principal, sendo as folhas cultivadas com a página abaxial voltada para o meio de cultura. As folhas foram cultivadas, em grupos de 6, em caixas de petri de 9 cm de diâmetro com cerca de 20 ml de meio de cultura. As placas foram colocadas na obscuridade durante 8 semanas a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e o seu desenvolvimento foi seguido semanalmente numa lupa OLYMPUS SZ-PT (OLYMPUS, Japan). Após este período, as folhas foram transferidas para meio fresco em frascos de cultura de 200 ml que foram colocados à luz com fotoperíodo de 16 h fornecido por lâmpadas OSRAM L36W/10 (Tageslicht, Daylight) a uma intensidade de $35 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$. As subculturas posteriores continuaram a realizar-se de 8 em 8 semanas.

Tabela 5.1 Composição dos diferentes meios de indução de embriogénese somática em folhas de ulmeiro, utilizando como meio base o meio MS

Meios	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8
Combinação	sem	2,3 μM	4,6 μM	9,0 μM	18,6 μM	2,3 μM	4,6 μM	9,0 μM
R.C.	R.C.	2,4-D	2,4-D	2,4-D	2,4-D	2,4-D	2,4-D	2,4-D
						+1,1 μM Kn	+1,1 μM Kn	+1,1 μM Kn
Composição	MS + 3% (p/v) sacarose + 0,7% (p/v) agar + 200 mg/l caseína hidrolisada pH 5,8							

R.C. – reguladores de crescimento; Kn - cinetina

e) confirmação da natureza do calo por microscopia óptica: A evolução dos calos foi acompanhada por microscopia óptica. Para o efeito, pequenas amostras de calo foram mergulhadas em carmim acético durante 15 min. Após este período estas eram espalmadas, apenas com o peso da lamela, sobre uma lâmina com uma gota de carmim acético. A observação destes esfregaços foi efectuada num microscópio óptico LABORLUX K (LEITZ WETZLAR, Germany).

5.2.1.2 Produção de embriões globulares

O calo embriogénico foi mantido nos meios de indução I2 e I6 (Tabela 5.1), com subculturas às 8 semanas, até à produção de embriões globulares. Na altura em que começaram a surgir os primeiros embriões, determinados parâmetros foram quantificados: 1) o número de explantes de calo embriogénico que formaram embriões globulares; 2) o número destes explantes que mantinham as características de calo embriogénico; 3) o número de explantes que eram suplantados pelo desenvolvimento de calo não embriogénico; 4) o número de explantes que não se desenvolviam e que necrosavam. Esta quantificação foi realizada 1 e 2 meses após a segunda subcultura (5 e 6 meses após o início da indução), em amostras de calos embriogénicos de cada condição de folhas (folhas de rebentos novos e folhas de rebentos velhos) no meio I2 e no meio I6. O ensaio foi executado duas vezes.

a) condições de proliferação dos embriões globulares: Os calos produtores de embriões globulares foram divididos em secções de 5 mm de lado, cujo peso foi determinado, e subcultivadas no meio de indução I6. Após 4 semanas, 11 destas secções foram escolhidas aleatoriamente para contabilizar o número de embriões produzido em cada uma delas. Desta forma, foi possível determinar o número de embriões globulares produzidos por grama do explante formador inicial.

b) observação histológica de amostras com embriões globulares: Amostras de material com embriões globulares foram fixadas numa solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v), desidratadas numa série de concentração crescente de etanol e incluídas em parafina. Secções de 10 µm de espessura foram obtidas usando um micrótomo de Minot EUROMEX (Holland). As secções cortadas de parafina foram passadas por uma série de xilol/etanol e montadas de forma permanente em bálsamo do Canadá. As observações foram realizadas num microscópio óptico LABORLUX K (LEITZ WETZLAR, Germany).

5.2.2 Alteração das condições do protocolo base de inoculação

Nesta secção, cada uma das condições do protocolo base de inoculação da secção 5.2.1.1 Indução de calo embriogénico (d) Condições do protocolo base de inoculação (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. escuro) foi alterada, individualmente, no sentido de determinar a sua importância na produção de calo embriogénico no meio I6 e na posterior produção de embriões globulares.

5.2.2.1 Efeito da inoculação inicial à luz (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. luz)

Com este ensaio pretendeu-se verificar a influência da inoculação à luz, durante as 8 primeiras semanas de indução. Para isso foi realizado um ensaio paralelo, apenas no meio de indução I6, em que folhas de rebentos novos foram inoculadas nas condições descritas acima, mas com fotoperíodo de 16 h fornecido por lâmpadas OSRAM L36W/10 (Tageslicht, Daylight) a uma intensidade de $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Na totalidade usaram-se 48 folhas que foram distribuídas, em grupos de 6, por 8 caixas de petri de 9 cm de diâmetro. O resto do procedimento foi semelhante ao descrito acima para o protocolo base.

5.2.2.2 Efeito da realização de mais cortes (folhas com 6 a 9 cortes e 8 sem. escuro)

O objectivo deste estudo foi determinar o efeito da execução de um maior número de cortes nas folhas, em relação ao protocolo base. Mais uma vez, foi realizado um ensaio paralelo, no meio de indução I6, com folhas de rebentos novos. Nessas folhas foram efectuados 6 a 9 cortes em vez dos 2 a 3 cortes descritos no protocolo inicial. Neste ensaio foram incubadas 6 folhas por caixa de petri de 9 cm de diâmetro, com um número total de 18 folhas. O resto do procedimento decorreu como já descrito.

5.2.2.3 Influência da incubação permanente do calo embriogénico no escuro

Com este ensaio pretendeu-se determinar a influência da manutenção do calo embriogénico na obscuridade na produção de embriões somáticos. Para isso, dois lotes de folhas de rebentos novos foram incubados no meio I6, nas condições já descritas. A única diferença no tratamento destes lotes residiu no facto de um deles ter sido sempre mantido na obscuridade. Em cada condição, usaram-se 48 folhas distribuídas por caixas de petri de 9 cm de diâmetro, com 6 folhas cada.

5.2.3 Histodiferenciação dos embriões globulares

Nestes ensaios foram utilizados 8 meios de cultura, utilizando o meio de MS com a constituição base referida para os meios de indução. Estes meios diferiam na composição e concentração dos reguladores de crescimento ou, na ausência destes, na concentração de sacarose e na presença de carvão activado (Tabela 5.2). Em cada meio foram colocados 30 explantes de calo embriogénico, com embriões globulares, em frascos de 200 ml, cada um com 5 explantes, sendo metade dos frascos colocados à luz ($35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) com fotoperíodo de 16 h e a outra metade na obscuridade. O ensaio foi realizado duas vezes.

Tabela 5.2 Composição dos diferentes meios testados na histodiferenciação dos embriões globulares.

Meios	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
Combinação	sem R.C.							
R.C.	0,5 mg/l			0,5 μM	0,5 μM	0,5 μM	1,1 μM	1,1 μM
	c.a.	sem R.C.	sem R.C.	2,4-D	2,4-D	ANA	Kn	BAP
	3% sac.	6% sac.	3% sac.	6% sac.	3% sac.	3% sac.	3% sac.	3% sac.
Composição	MS + 0,7% (p/v) agar + 200 mg/l caseína hidrolisada, pH 5,8							

sac. – sacarose; c.a. – carvão activado; R.C. – reguladores de crescimento; Kn - cinetina

Após 4 semanas foi feita uma avaliação qualitativa do seguinte conjunto de parâmetros: 1) proliferação do número de embriões globulares; 2) produção de calo embriogénico; 3) produção de embriões precocemente germinados (e.p.g.s) (ver definição

na pág. 154); 4) produção de embriões secundários anómalos; 5) produção de raízes adventícias; 6) produção de calo não embriogénico.

Após esta avaliação, todo o material que apresentava diferenciação foi novamente subcultivado para o meio em que anteriormente se encontrava.

5.2.4 Obtenção de e.p.g.s em calo embriogénico

Calo embriogénico com 4 meses, contados após o início da indução no meio I6, foi subcultivado para placas de petri de 9 cm de diâmetro, com meio base de MS e 3% de sacarose. Nas duas experimentações realizadas, foram utilizados 80 + 58 calos sendo os primeiros colocados na obscuridade e os segundos à luz a uma intensidade de 35 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ com fotoperíodo de 16 h. Os resultados foram registados 4 semanas após a transferência para meio basal.

Numa tentativa de amplificar a frequência de regeneração de embriões precocemente germinados (e.p.g.s) os calos anteriores foram novamente subcultivados para meio base de MS com 3% de sacarose, para determinar se estes ainda possuíam capacidade de produção de mais embriões deste tipo. Para esta experimentação foram escolhidas amostras aleatórias das populações de calos que, depois de seccionados, deram origem aos novos explantes. Estes foram subcultivados para meio em presença de luz, nas condições acima descritas. Após 4 semanas os resultados obtidos foram quantificados: 1) o número de explantes que formaram e.p.g.s; 2) o número de explantes que formaram raízes adventícias; 3) o número de explantes em que apenas houve proliferação do calo não embriogénico.

Os e.p.g.s produzidos, em ambas as fases deste ensaio, foram contabilizados e transferidos para os meios de conversão.

5.2.4.1 Obtenção de e.p.g.s após subcultura do calo embriogénico em meio líquido

Calo embriogénico mantido no meio de indução I6 durante 4 meses, foi utilizado num ensaio de cultura de células em suspensão. Para isso cerca de 1 g de calo foi colocado em matrizes de 50 ml com 10 ml de meio líquido de MS com 3% de sacarose, mas sem

reguladores de crescimento. Os recipientes foram colocados na obscuridade a 100 r.p.m. O meio líquido das suspensões foi renovado três vezes a intervalos de 1 semana. Após este período, 2 ml da suspensão foram vertidos sobre círculos de papel de filtro, colados à superfície de 6 placas de cultura de 9 cm diâmetro, com o mesmo meio, em presença de luz a uma intensidade de $35 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ e com fotoperíodo de 16 h. Os resultados foram registados às 3 semanas e todo o ensaio foi executado duas vezes.

5.2.4.2 Conversão dos e.p.g.s

Para estudar a frequência de conversão dos e.p.g.s, foram testados dois meios com redução da concentração salina de MS para metade e com 1% (C1) e 2% (C2) (p/v) de sacarose. Os embriões foram colocados em frascos de 200 ml de capacidade com 20 ml de meio de cultura a uma intensidade luminosa de $62 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 h. Foram realizados dois ensaios independentes para cada meio, com 3 a 5 embriões por frasco tendo sido efectuadas 13 réplicas em C1 totalizando 52 embriões e 11 réplicas em C2 totalizando 44 embriões. Os resultados foram registados após 6 semanas.

5.2.4.3 Aclimatização de plantas obtidas de e.p.g.s

Para este ensaio escolheu-se para controlo um lote de plantas micropropagadas no meio DKW1 (Cap. 2) que, a nível morfológico (grossura do caule, tamanho das folhas e altura da planta), fosse semelhante ao lote de plantas obtido a partir de embriões somáticos. Foram aclimatizadas, em dois ensaios repetidos, 18 plantas com origem em embriões somáticos e 24 plantas provenientes da micropropagação no meio DKW1.

O substrato utilizado consistia numa mistura estéril de turfa e perlite na proporção de 3:2 (v/v) e foi colocado em vasos de 500 ml de capacidade. Após a remoção das plantas do meio agarizado, o sistema radicular foi lavado com água estéril para eliminar convenientemente os restos de meio de cultura e as folhas que tocavam o substrato foram removidas. As plantas foram então colocadas nos vasos, inserindo o sistema radicular num orifício central feito no substrato, deixando as raízes o mais estendidas possível. O

conjunto vaso + planta foi posteriormente aspergido com uma solução de Benlate® a 1g/l com repetição deste procedimento, quando necessário, para evitar o desenvolvimento de fungos. Nos primeiros dias, as plantas foram pulverizadas, sempre que necessário, com água destilada estéril para que as folhas não murchassem. O teor de humidade relativa foi gradualmente diminuído, espaçando no tempo as pulverizações, e aumentando periodicamente a abertura da câmara de aclimatização. As plantas sobreviventes a todo este processo continuaram o seu crescimento na estufa sujeitas a um fotoperíodo de 16 h de luz emitida por conjuntos de lâmpadas Osram que irradiam em média 444 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. A temperatura da estufa era de 24 ± 2 °C e a humidade relativa de cerca de 85%.

5.2.5 Embriogénese repetitiva a partir de e.p.g.s

5.2.5.1 Cultura dos e.p.g.s em meio basal

Os embriões precocemente germinados (e.p.g.s) de anormal morfologia, que não se converteram em plantas, foram subcultivados para placas de petri de 9 cm de diâmetro com meio base de MS com 3% de sacarose, solidificado com 0,25% (p/v) de gelrite ou com 0,7% (p/v) de agar purificado. Antes da sua inoculação, os embriões foram feridos com uma lâmina de bisturi e depois colocados no meio de cultura com o máximo da sua superfície em contacto com este. A inoculação deste material foi realizada em presença de luz a uma intensidade de 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ com fotoperíodo de 16 h. Este ensaio foi realizado quatro vezes em amostras de pelo menos 15 e.p.g.s.

5.2.5.2 Determinação do número de embriões em calo embriogénico formado *de novo*

Este ensaio foi realizado com o objectivo de determinar o número de embriões somáticos produzidos por grama de calo embriogénico formado *de novo* a partir dos e.p.g.s. Um número total de 32 explantes de calo embriogénico, cada um com 5 mm de lado, foram pesados e inoculados em meio base de MS com 3% de sacarose, usando gelrite (0,25% (p/v)) como agente gelificante em caixas de petri de 9 cm de diâmetro. Todo o procedimento foi realizado na obscuridade até à obtenção de embriões em fase cotiledonar.

Nesta altura (uma semana antes do registo dos resultados), as placas foram transferidas para uma prateleira da sala de cultura com luz a uma intensidade de 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 h. O número de embriões somáticos, obtido em cada explante, foi registado 6 semanas após a subcultura. O ensaio foi executado duas vezes.

5.2.6 Observações em microscopia electrónica de varrimento (M.E.V.)

As pequenas peças de material foram fixadas numa solução de 2,5% (v/v) de glutaraldeído em tampão Pipes a 1,25% (p/v) (pH 7,4) durante 2h, lavadas exaustivamente, no mesmo tampão e desidratadas numa série de concentração crescente de álcool. Posteriormente, as amostras foram transferidas para acetona a 100% e colocadas num aparelho de ponto crítico em que o líquido de desidratação é substituído por CO_2 . As amostras foram montadas em suportes cilíndricos de alumínio, recobertas com ouro/paladium e examinadas num microscópio electrónico de varrimento Jeol JSM 5400.

5.2.7 Análise estatística

Todos os valores percentuais foram transformados pela função $\arcsin\sqrt{x}$ ($\text{ASIN}(\text{SQRT}(X/100))$) antes de serem tratados estatisticamente, mas são aqui apresentados não transformados. A significância da diferença entre as médias foi analisada pela distribuição t-Student para $P \leq 0,05$. Antes da aplicação do teste t foi verificada a diferença entre as variâncias empregando o teste de Fisher (teste F) e quando estas eram significativamente diferentes foi realizado um teste t aproximado (Dytham 1999). Todos os cálculos foram efectuados usando o programa Microsoft® Excel X for Mac®.

5.3 Resultados

5.3.1 Produção de embriões globulares em calo embriogénico

5.3.1.1 Efeito do meio de indução e da idade dos rebentos na produção de calo

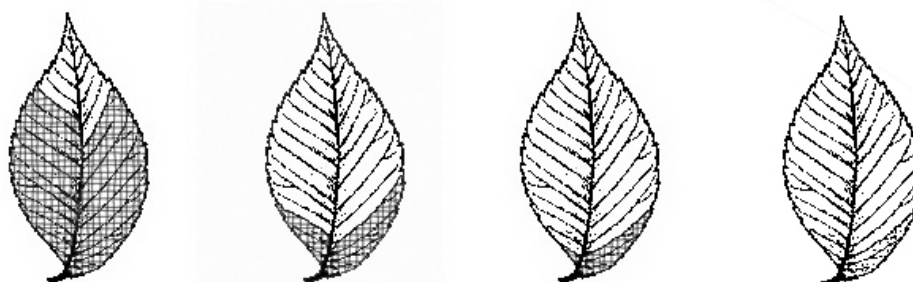
A formação de calo foi observada em todos os meios testados, excepto nos meios I1 e I5. Na Tabela 5.3 é apresentada a percentagem de folhas provenientes de rebentos novos e de rebentos velhos que produziram calo nos diferentes meios de indução experimentados.

Tabela 5.3 Quantificação da produção de calo e observação do desenvolvimento das folhas colocadas nos 8 meios testados para a indução de calo embriogénico, utilizando como meio base o meio MS. Resultados obtidos após 8 semanas de indução no escuro. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de dois ensaios independentes perfazendo um total de 24 folhas, de cada tipo de rebento, por meio. Em cada linha as médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Meio	Composição Dos Meios	% Folhas com calo		Tipo de desenvolvimento observado
		Folhas de rebentos novos	Folhas de rebentos velhos	
I 1	0,0 μ M 2,4-D	0,0 a	0,0 a	Sem produção (-) as folhas intumesceram, enrugaram e fenolizaram
I 2	2,3 μ M 2,4-D	100,0 a	100,0 a	Boa produção (+++) de calo em todas as folhas
I 3	4,6 μ M 2,4-D	93,8 \pm 12,4 a	100,0 a	Produção mínima (+) de calo em quase todas as folhas
I 4	9,0 μ M 2,4-D	60,4 \pm 39,8 a	54,2 \pm 21,4 a	Produção mínima (+) de calo em cerca de 1/2 das folhas
I 5	18,4 μ M 2,4-D	0,0 a	0,0 a	Sem produção (-) de calo, as folhas apenas fenolizaram
I 6	2,3 μ M 2,4-D +1,1 μ M Kn	100,0 a	100,0 a	Boa produção (+++) de calo em todas as folhas
I 7	4,6 μ M 2,4-D +1,1 μ M Kn	100,0 a	100,0 a	Produção mínima (+) de calo em todas as folhas
I 8	9,0 μ M 2,4-D +1,1 μ M Kn	72,9 \pm 26,6 a	68,8 \pm 18,8 a	Produção mínima (+) de calo em cerca de 2/3 das folhas

Desde o primeiro mês que se notou uma grande diferença na produção de calo, em função do meio, sendo esta mais acentuada nos meios I2 e I6, relativamente aos outros, onde esta foi muito diminuta. Esta diferença de produção manteve-se e, após dois meses em cultura, o crescimento deste tecido abrangia quase toda a superfície da folha nos meios I2 e I6 mas, nos outros meios, a sua produção continuava muito baixa cobrindo apenas uma área muito pequena da folha (Tabela 5.3) (Esquema 5.1). Relativamente à origem das folhas, não se verificaram diferenças nos resultados, uma vez que, a percentagem de folhas de rebentos novos e de rebentos velhos que produziram calo, em cada um dos meios testados, não foi estatisticamente diferente. Para além disso, em relação à quantidade de tecido produzido também não se verificaram diferenças entre as folhas das duas origens, colocadas no mesmo meio de indução.

Pelos dados apresentados, constata-se que foi a concentração de 2,4-D dos meios de indução que determinou a produção de calo, independentemente da presença de cinetina. No Esquema 5.1 são apresentados dados qualitativos representativos da área da folha coberta pelo calo, para as concentrações de 2,4-D utilizadas: 1) boa produção de calo nos meios que continham 2,3 μM de 2,4-D (I2 e I6); 2) produção mínima de calo nos meios com 4,6 μM de 2,4-D (I3 e I7); 3) produção diminuta de calo nos meios com 9,0 μM de 2,4-D (I4 e I8) mas, ligeiramente inferior à produção na concentração anterior; 4) nenhuma produção de calo nos meios de cultura em que a concentração de 2,4-D era igual a zero (I1) ou a 18,4 μM (I5).



Esquema 5.1 Esquema representativo da área da folha coberta por calo (sombreado cinzento), tendo em conta as concentrações de 2,4-D utilizadas nos meios de indução: da esquerda para a direita 2,3; 4,6; 9,0 e 18,4 μM .

Avaliando estes resultados, pode-se concluir que a produção de calo diminuiu com o aumento da concentração de 2,4-D. Apesar de haver produção entre 4,6 e 9,0 μM de 2,4-D, as tentativas de subcultura destes calos foram infrutíferas, provavelmente, devido à insuficiente quantidade do inóculo. Por esta razão, apenas os meios I2 e I6 foram os seleccionados para a indução de embriogénese somática.

5.3.1.2 Resultados da indução de calo embriogénico nos meios I2 e I6

Dado que apenas os meios I2 e I6 produziram calo em quantidade suficiente para o prosseguimento dos ensaios, estes foram os únicos cujo estudo foi continuado em pormenor.

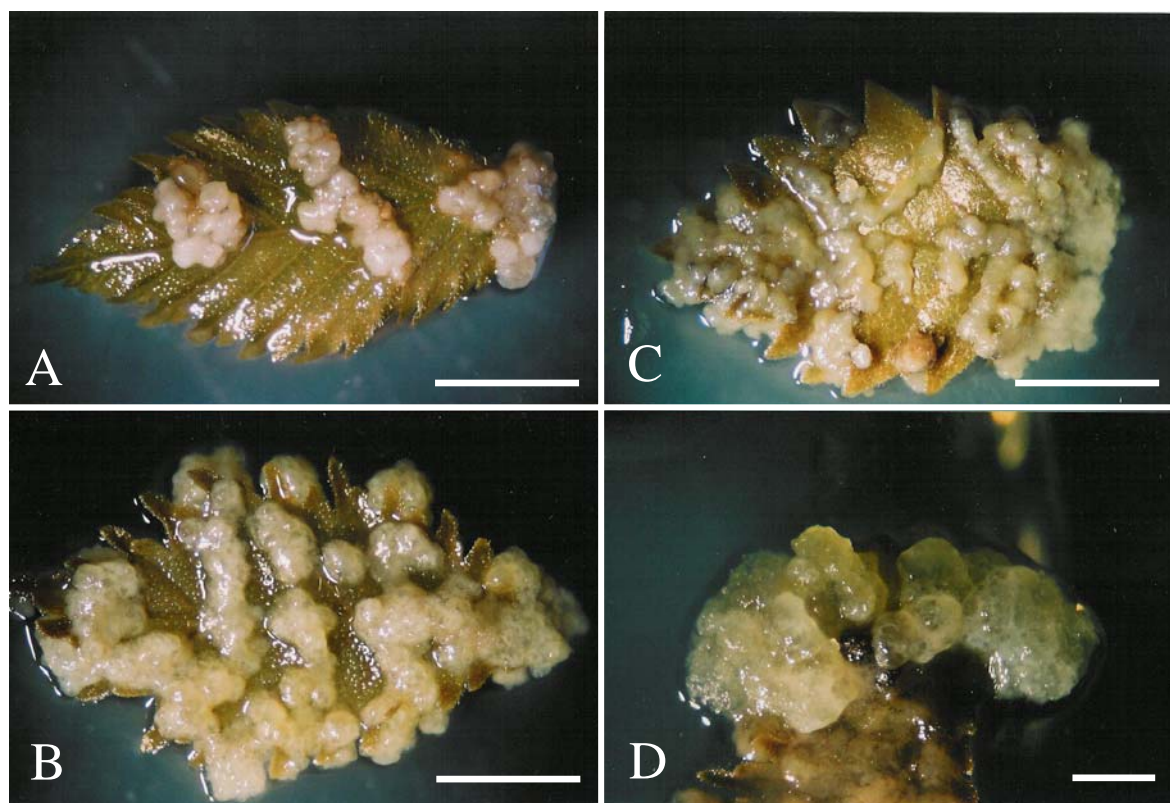


Figura 5.1 Produção de calo embriogénico em folhas de ulmeiro nas condições base de inoculação (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. escuro). (A) Folha de rebento novo que mostra formação de calo, ao nível das nervuras e das 3 zonas de corte, no meio de indução I6, 4 semanas após a cultura inicial. (B) Folha nas mesmas condições que a anterior, 8 semanas após a cultura inicial. (C) Folha de rebento velho no meio I6, às 8 semanas, que mostra formação de calo de aspecto mais desfeito que o obtido em folhas de rebentos novos (as barras em A, B e C valem 3,3 mm). (D) Porção de calo embriogénico com 12 semanas. Notar o aspecto mucilaginoso do tecido e o seu crescimento em forma de glóbulos (a barra vale 1,5 mm).

Cerca de quatro semanas após a cultura inicial, nestes meios era apenas possível observar que, em certas zonas da folha, se tinham formado pequenos agregados de tecido indiferenciado. À lupa, este tecido mostrava um aspecto mucilaginoso, translúcido em algumas zonas, branco ou amarelo claro, que se apresentava sob a forma de calos globulosos. Este formava-se, após a folha ter ficado castanha, principalmente a partir do pecíolo e das zonas de corte que interceptavam as nervuras (Fig. 5.1A).

Comparando a resposta dada pelas folhas dos dois tipos de rebentos (Fig.s 5.1B e 5.1C), verificou-se que, de uma forma geral, o tecido produzido nas folhas provenientes de rebentos velhos era, em termos morfológicos, ligeiramente diferente do produzido nas folhas da outra condição. O tecido formado nestas folhas não apresentava glóbulos tão definidos como os observados nas folhas de rebentos novos e mostrava um aspecto geral mais desfeito (Fig. 5.1C).

5.3.1.3 Confirmação da natureza do calo em microscopia óptica

A observação, por microscopia óptica, do calo produzido (Fig. 5.1D) confirmou que este possuía as características geralmente referidas para as células embriogénicas. Esfregaços deste tecido, em carmim acético, mostraram que as células eram pequenas, isodiamétricas, tinham grande quantidade de grãos de amido e um núcleo central proeminente (Fig.s 5.2A e 5.2B). Estas encontravam-se em agregados de número variável

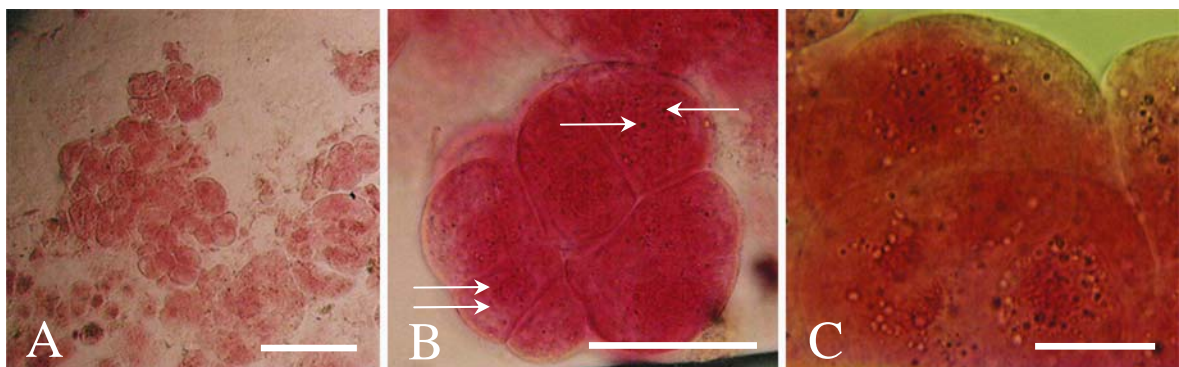


Figura 5.2 Observação de esfregaços de calo embriogénico. (A) Esfregaço de uma amostra de calo embriogénico com 12 semanas, formado no meio de indução I6, que evidencia a presença de células embriogénicas (a barra vale 123 μm). (B) Pormenor de um grupo de células com núcleo proeminente (dupla seta) e abundância de grãos de amido (setas) (a barra vale 31 μm). (C) Figuras mitóticas observadas nas células de calo embriogénico (a barra vale 41 μm).

(Fig. 5.2B), sendo frequente a observação de figuras mitóticas (Fig. 5.2C). Embora, em termos morfológicos, o tecido produzido em folhas de rebentos novos e de rebentos velhos fosse ligeiramente diferente, os esfregaços destes tecidos mostraram, para ambas as proveniências, as características acima referidas.

5.3.1.4 Evolução das culturas de calo embriogénico

Com o decorrer da idade da cultura, a quantidade de calos embriogénicos diminuiu rapidamente. Esta diminuição do número de calos embriogénicos foi devida ao desenvolvimento de calo não embriogénico (Fig. 5.3A), que se sobrepôs ao do calo embriogénico. O calo não embriogénico distinguia-se facilmente do primeiro porque, num mesmo período de tempo, apresentava uma proliferação muito superior à do calo embriogénico (Fig. 5.3A). Para além disso, em esfregaço este calo possuía células longas com grandes vacúolos. O Gráfico 5.1 apresenta uma evolução da percentagem de calos embriogénicos cujo crescimento foi ultrapassado pelo do calo não embriogénico, num intervalo compreendido entre os dois e os seis meses após a indução, em material proveniente de folhas de rebentos novos no meio I6.

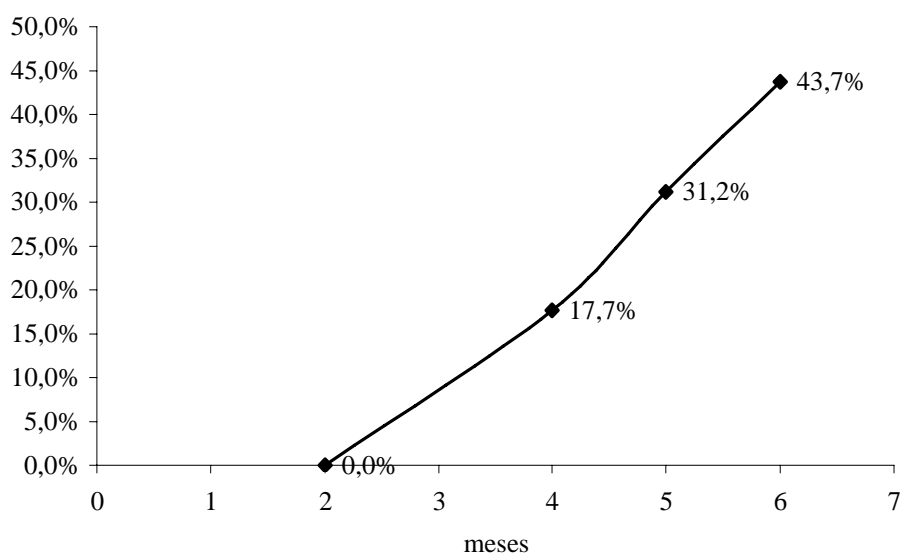


Gráfico 5.1 Percentagem de calos embriogénicos que foram cobertos por calo não embriogénico. Quantificação realizada para os calos produzidos no meio I6, a partir de folhas de rebentos novos, entre os 2 e os 6 meses após o início da indução.

No momento da segunda repicagem para o meio de indução (aos quatro meses), a percentagem de calos embriogénicos cujo crescimento tinha sido suplantado era de 17,7% (n=34). Um mês após aquela subcultura, a percentagem destes calos era já de 31,2% e, aos seis meses, 43,7% dos calos embriogénicos tinham sido perdidos devido a esta causa.

Este acentuado desenvolvimento de calo não embriogénico não foi, no entanto, observado nos ensaios em que o calo embriogénico não foi submetido a subculturas intercalares. Calos embriogénicos, obtidos no meio I6, foram apenas submetidos à subcultura realizada dois meses após a indução, sem serem separados dos fragmentos de folha do explante inicial. Ao longo do tempo, houve proliferação de novo calo embriogénico, de forma lenta e gradual, sem haver produção de calo não embriogénico. Foi notório, nestes ensaios, que o aparecimento de calo não embriogénico era muito menos frequente que nos ensaios em que os calos embriogénicos eram submetidos a subculturas intercalares. Foi este o caso do material apresentado na Figura 5.3B. O exemplo apresentado foi fotografado oito meses após o início da indução e permaneceu no mesmo meio de cultura durante seis desses meses.



Figura 5.3 Evolução das culturas de calo embriogénico. (A) Diferenças de crescimento entre exemplares de calo embriogénico que mantiveram as suas características (frasco da direita) e de calo embriogénico cujo crescimento foi ultrapassado pelo de calo não embriogénico (frasco da esquerda) (a barra vale 1 cm). (B) Calo embriogénico mantido junto ao explante inicial, no meio de indução I6, sem subculturas intercalares (a barra vale 1,3 mm).

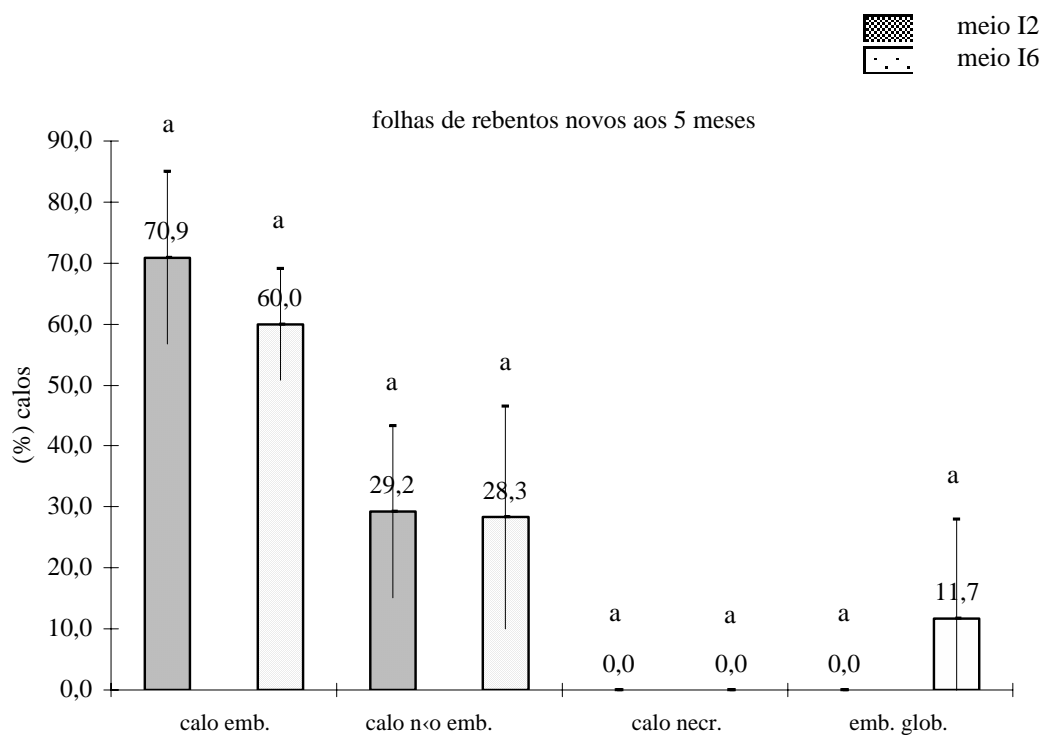


Gráfico 5.2A Comparação do comportamento (expresso em %) dos calos produzidos nos meios I2 e I6 a partir de folhas de rebentos novos, aos 5 meses de indução.

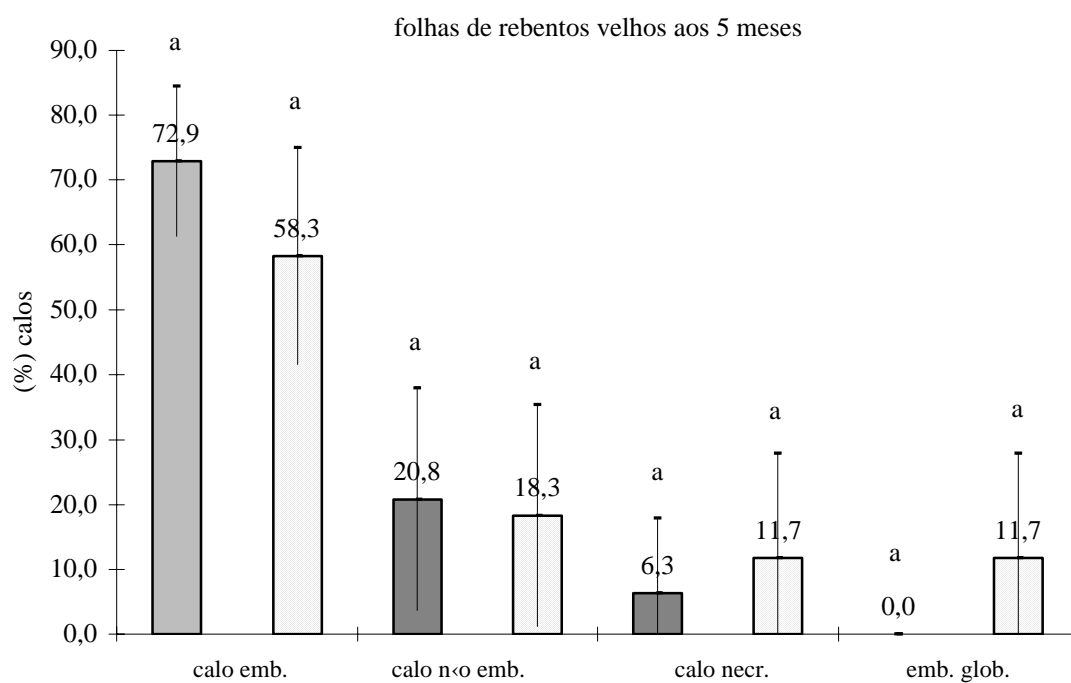


Gráfico 5.2B Comparação do comportamento (expresso em %) dos calos produzidos nos meios I2 e I6 a partir de folhas de rebentos velhos, aos 5 meses de indução.

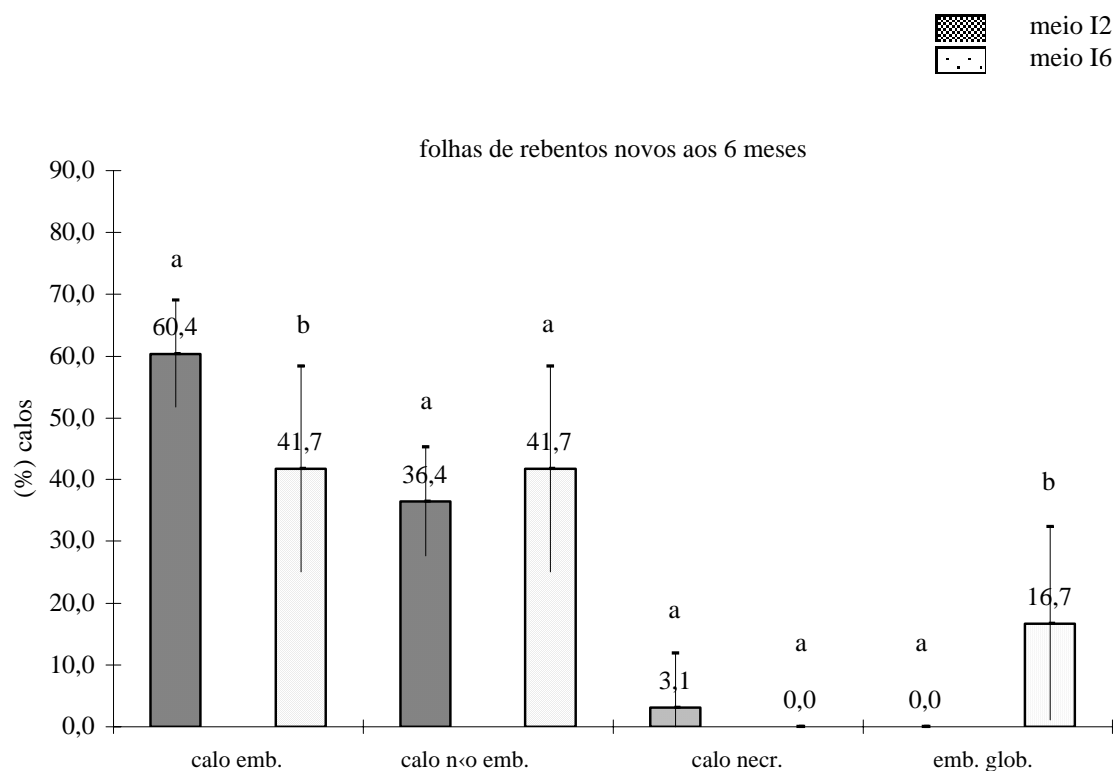


Gráfico 5.3A Comparação do comportamento (expresso em %) dos calos produzidos nos meios I2 e I6 a partir de folhas de rebentos novos, aos 6 meses de indução.

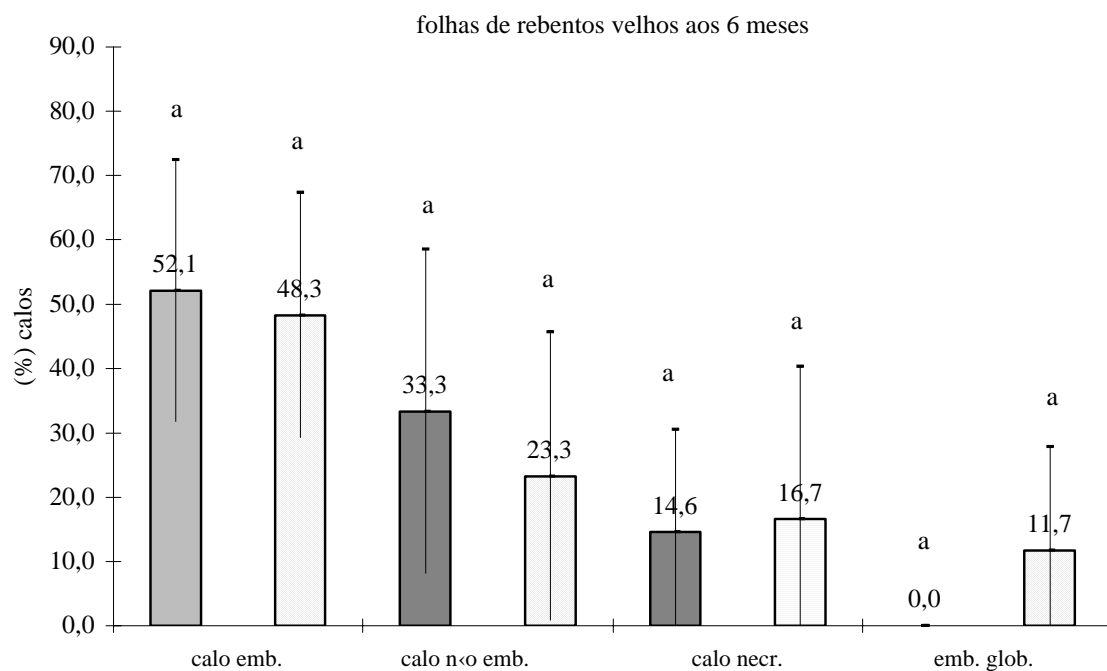


Gráfico 5.3B. Comparação do comportamento (expresso em %) dos calos produzidos a partir de folhas de rebentos velhos nos meios I2 e I6, aos 6 meses de indução.

Legenda geral dos Gráficos 5.2A e B e 5.3A e B: calo emb. - % de calos embriogénicos que mantiveram as suas características; calo não emb. - % de calos embriogénicos que foram cobertos por calo não embriogénico; calo necr. - % de calos embriogénicos que sofreram necrose; emb. glob. - % de calos embriogénicos que produziram embriões globulares. Os valores das barras representam a média e as linhas verticais indicam os desvios padrão de dois ensaios de 10 réplicas no meio I6 e 16 réplicas no meio I2 com 3 a 4 explantes por réplica, perfazendo cerca de 34 explantes no meio I6 e 54 explantes no meio I2, para cada tipo de folha. Os valores dos pares de barras, da mesma categoria do eixo do x, que estão acompanhados de uma letra diferente, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Um outro factor que também contribuiu para a diminuição do número de calos embriogénicos foi o aparecimento de calos em necrose. Os Gráficos 5.2A e B e 5.3A e B representam, em termos percentuais, o comportamento dos calos embriogénicos entre o quinto e o sexto mês de indução, nos dois meios de cultura testados, para os dois tipos de folhas que foram utilizados. Pela observação destes gráficos pode-se verificar que a percentagem de calos embriogénicos que mantiveram as suas características diminuiu, ao mesmo tempo que aumentou a percentagem de calos não embriogénicos e de calos necrosados. Relativamente aos três parâmetros até aqui enunciados, representados nos gráficos acima referidos, foram realizados testes estatísticos para verificar se existiriam diferenças significativas na resposta do mesmo tipo de folha cultivada nos meios I2 e I6 e dos dois tipos de folhas cultivadas no mesmo meio. Destes testes, apenas aos seis meses, os valores da percentagem de calos embriogénicos, provenientes de folhas novas, nos meios I2 e I6 foram significativamente diferentes (60,4% em I2 e 41,7% em I6). Em todos os outros parâmetros não foram encontradas diferenças significativas. Tendo isto em conta, pode-se então dizer que, de uma forma geral, o tipo de folha e o meio utilizado não influenciaram os parâmetros: manutenção das características do calo embriogénico, produção de calo não embriogénico e necrose do calo embriogénico.

5.3.1.5 Produção de embriões globulares

Entre os cinco e os seis meses de indução, os calos embriogénicos mantidos no meio I6 perderam o seu aspecto mucilaginoso à medida que a sua superfície se tornava compacta e com um aspecto “açucarado” (Fig. 5.4A). Estruturas globulares sobressaíram da superfície destes calos (Fig. 5.4A) a uma frequência máxima de indução, aos seis meses, igual a 16,7% (Gráfico 5.3A) nos calos de folhas novas. Preparações histológicas deste

calos provaram que estas estruturas eram embriões somáticos em fase globular, cujo tamanho variava entre 200 e 600 μm de diâmetro, que se encontravam completamente isolados do tecido adjacente (Fig.s 5.4A e 5.4C). O número de embriões produzido por calo era muito variável. Houve casos de calos que produziram apenas um embrião e outros em que esse número era superior a 60.



Figura 5.4 Produção de embriões globulares em culturas de calo embriogénico. (A) Explante de calo embriogénico com embriões globulares, 5 meses após a indução no meio I6. Notar o endurecimento do calo, à superfície, onde se formam os embriões globulares (a barra vale 600 μm). (B) Novos embriões globulares em proliferação numa pequena secção de um explante original formador de embriões globulares (a barra vale 192 μm) (a zona delimitada foi observada em M.E.V. e é apresentada nas Figuras 5.16C e 5.16D). (C) Corte longitudinal de uma peça com embriões globulares nas condições da Figura 5.4A, imediatamente a seguir à colagem da ténia sobre a lamina. Notar que os embriões se encontram separados do tecido adjacente, situado abaixo destes (a barra vale 300 μm).

Apenas no meio I6 foram produzidos embriões globulares a partir dos calos embriogénicos (Gráficos 5.2A e B e 5.3A e B). Os embriões globulares surgiram tanto em calos embriogénicos obtidos a partir de folhas de rebentos novos como de rebentos velhos, variando esta produção entre 11,7 a 16,7%, entre o quinto e o sexto mês de indução. Nos calos que permaneceram no meio I2, que divergia do meio I6 apenas pela ausência de cinetina (Kn), essa formação nunca se deu (Gráficos 5.2A e B e 5.3A e B). Estatisticamente, verificaram-se diferenças significativas entre o meio I6 e o meio I2 na percentagem de calos embriogénicos que produziram embriões, quando foram utilizadas folhas de rebentos novos (Gráfico 5.3A). Por esta razão, todo o material usado em ensaios posteriores teve origem em folhas de rebentos novos inoculadas no meio I6. A subcultura dos calos com seis meses de idade, que ainda mantinham as características de embriogénicos, mas que não possuíam embriões, não surtiu qualquer efeito. Após a subcultura, estes calos acabaram por necrosar.

Apesar do número de calos embriogénicos formadores de embriões globulares não ter sido muito elevado, estes possuíam uma grande capacidade de proliferação destes

embriões, após subcultura. Quando divididos e subcultivados em meio fresco de indução, novos embriões globulares foram produzidos entre os primeiros embriões e/ou em zonas do explante sem embriões (Fig. 5.4B). Com este procedimento, foram atingidos números de 103 embriões globulares em secções de 5 mm de lado dos explantes iniciais, sendo a percentagem de proliferação de 95% (amostra com 40 explantes). Num cálculo em que foi tido em conta o peso de cada explante obtiveram-se, em média, 90 (\pm 59,1) embriões globulares por grama do explante inicial, numa amostra de explantes escolhidos aleatoriamente entre a população de formadores. Após cerca de três ciclos de produção mensal, a proliferação de embriões globulares cessava, os explantes formavam calo não embriogénico, acastanhavam e morriam.

5.3.2 Alteração das condições do protocolo base de inoculação

Nesta secção, cada uma das condições do protocolo base de inoculação (ver secção 5.2.1.1 Indução de calo embriogénico (d) Condições do protocolo base de inoculação - folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. escuro) foi alterada, individualmente, no sentido de determinar a sua importância na produção de calo embriogénico no meio I6 e na posterior produção de embriões globulares.

5.3.2.1 Efeito da inoculação das folhas à luz (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. luz)

Contrariamente ao observado nas condições base de inoculação (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. escuro) as folhas inoculadas à luz (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. luz) mostraram desde a primeira semana, a olho nu, o desenvolvimento de um tecido indiferenciado que proliferava muito rapidamente e que, no final da segunda semana, cobria já toda a superfície da folha. Durante este período a folha manteve-se verde, contrariamente ao observado com as folhas do protocolo base que rapidamente ficaram castanhas. Morfologicamente, este tecido apresentava as características já enunciadas para o calo não embriogénico descrito anteriormente (ver secção 5.3.1.4 Evolução das culturas de calo embriogénico) e, por esta razão, foi designado da mesma forma. Entre a terceira e a quarta semanas, este tecido atingiu o máximo desenvolvimento e, a partir daqui, o resto do

explante foliar e o tecido formado começaram a ficar castanhos. Três meses após a indução (um mês após a primeira subcultura para meio fresco de indução, realizada aos dois meses), verificou-se o desenvolvimento de um calo com as características do calo embriogénico já descritas (ver secção 5.3.1.3 Observação do calo em microscopia óptica). Ao contrário do primeiro tecido, este calo embriogénico desenvolvia-se muito lentamente espalhando-se em camada sobre o meio de cultura e rodeava o calo inicial, fortemente fenolizado.

Na população de calos embriogénicos, induzidos nestas condições, também foram obtidos embriões globulares, de forma semelhante à descrita (ver secção 5.3.1.5 Produção de embriões globulares) mas, a uma percentagem muito inferior (2,0% *versus* 11,7%) à obtida nas condições base de inoculação.

5.3.2.2 Efeito da execução de mais cortes (folhas com 6 a 9 cortes e 8 sem. escuro)

Neste ensaio foram executados nas folhas 6 a 9 cortes transversais (folhas com 6 a 9 cortes e 8 sem. escuro), mantendo a componente de obscuridade do protocolo base de inoculação. Apesar da diferença de condições, os resultados aqui obtidos foram muito semelhantes aos descritos acima para as folhas colocadas à luz com apenas 2 a 3 cortes. Inicialmente, as folhas produziram calo não embriogénico, em redor do qual, depois de fenolizado, surgiu tardiamente o calo embriogénico. No entanto, apesar de seis meses após a inoculação terem sido verificadas modificações da superfície dos calos, do tipo das observadas antes da formação dos embriões globulares (ver secção 5.3.1.5 Produção de embriões globulares), estes não foram produzidos neste ensaio.

5.3.2.3 Influência da incubação permanente do calo embriogénico no escuro

Com este ensaio confirmou-se a necessidade da transferência do calo embriogénico para a luz, depois de induzido no escuro. Nos calos mantidos sempre na obscuridade não houve formação de embriões globulares. No grupo de calos embriogénicos transferidos para a luz, depois das oito semanas de indução no escuro, os primeiros embriões globulares

surgiram, cinco meses após a indução, de forma semelhante à descrita anteriormente (ver secção 5.3.1.5 Produção de embriões globulares). Registou-se, no entanto, um resultado curioso nos calos mantidos na obscuridade. No lote de calos embriogénicos mantido no escuro, o número de calos que apresentavam características de embriogénicos era muito superior ao do lote mantido à luz. A percentagem de calos que mantinham as suas características, cinco meses após a indução, era de 92,7% para o lote colocado no escuro e de 49,1% para os calos colocados à luz, sendo esta diminuição essencialmente provocada pelo desenvolvimento de calo não embriogénico.

5.3.3 Histodiferenciação dos embriões globulares

Uma vez que no meio de indução I6, os embriões somáticos raramente ultrapassaram a fase globular e a presença de embriões em fase cordiforme era esporádica, testaram-se condições para promover a histodiferenciação dos embriões globulares.

Foram então testados oito meios de cultura, tendo o meio MS como meio base, colocando-se metade do material no escuro e a outra à luz (Tabela 5.4): D1) meio base com 0,5% de carvão activado; D2) meio base com 6% de sacarose; D3) meio base com 3% de sacarose; D4) meio em que foi removida a citocinina e reduzida a auxina (2,4-D), do meio de indução, para 1/5 da sua concentração e com 6% de sacarose; D5) igual ao meio anterior mas com 3% de sacarose; D6) substituição no meio anterior do 2,4-D por outra auxina (ANA); D7) remoção do 2,4-D do meio de indução deixando apenas a citocinina (Kn); D8) substituição da Kn do meio anterior por outra citocinina (BAP).

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.4. Aparentemente, nenhuma das condições testadas promoveu a histodiferenciação dos embriões globulares até à fase cotilédonar.

Os meios com 2,4-D (D4 e D5) foram os únicos em que houve proliferação do número de embriões globulares, semelhante à observada no meio de indução I6, sendo esta superior no meio com apenas 3% de sacarose, relativamente ao mesmo meio com potencial osmótico inferior (6% de sacarose). No entanto, a redução da concentração de 2,4-D para cerca de 1/5 e a exclusão da cinetina do meio não foram condições suficientes para promover o desenvolvimento dos embriões. Nestes meios, assim como no meio de indução

I6, após cerca de três ciclos de multiplicação os embriões deixaram de proliferar e os explantes mostraram tendência para formar calo não embriogénico, acabando por fenolizar e eventualmente morrer.

Tabela 5.4 Quantificação qualitativa do tipo de desenvolvimento observado em explantes com embriões globulares quando transferidos para 8 meios, que tinham o meio MS como meio basal, numa tentativa de histodiferenciação desses embriões. Resultados observados após 4 semanas, em condições de luminosidade, em 30 explantes colocados em cada meio.

Meios	Composição dos meios	Proliferação n° embriões globulares	Produção calo emb.	Produção e. p. g. s	Produção emb. sec. anómalos	Produção raízes adventícias	Produção calo não emb.
D1	MS+ 0,5 mg/l c.a. 3% sac.	—	—	+	—	+	++
D2	MS 6% sac.	—	—	+	+	+	++
D3	MS 3% sac.	—	—	+	+	+	+++
D4	MS+ 0,5µM 2,4-D 6% sac.	+	+	—	—	—	±
D5	MS+ 0,5µM 2,4-D 3% sac.	++	++	—	—	—	+
D6	MS+ 0,5µM ANA 3% sac.	—	±	+	+	++	+++
D7	MS+ 1,1µM Kn 3% sac.	—	±	—	—	—	+++
D8	MS+ 1,1µM BAP 3% sac.	—	±	—	—	—	+++
I6*	MS+ 2,3µM 2,4-D + 1,1µM Kn	+++	+++	—	—	—	+

* meio de indução I6, aqui colocado para comparação com os meios de histodiferenciação testados
c.a. – carvão activado; sac. – sacarose; Kn - cinetina

De uma forma geral, em todos os outros meios referidos na Tabela 5.4, os embriões intumesceram e agregaram-se uns aos outros formando “massas únicas e compactas” (Fig. 5.5A). Com o decorrer do tempo, o tecido destas massas desdiferenciava ou então adquiria um aspecto seco e espumoso (Fig.s 5.5B e 5.5C). Em alguns dos meios testados (D2, D3 e D6), sobre este tecido espumoso formaram-se, esporadicamente, embriões secundários anómalos (Fig. 5.5C).

Noutros, houve produção de calo embriogénico na periferia dos explantes subcultivados. Este resultado verificou-se nos meios com 2,4-D (D4 e D5), de forma acentuada e constante, e nos meios D6, D7 e D8 com uma produção muito menor verificando-se apenas na primeira semana a seguir à subcultura.

Nos meios sem reguladores de crescimento (D1 a D3) e no meio com ANA (D6), como auxina, surgiram estruturas com dois cotilédones verdes e raiz muito alongada que se destacavam facilmente do tecido adjacente. Estas estruturas foram designadas como embriões precocemente germinados (e.p.g.s) (ver definição na secção 5.3.3 Obtenção de e.p.g.s a partir de calo embriogénico) (Fig. 5.5D). O número de explantes regeneradores de e.p.g.s no meio D3 atingiu uma percentagem de 6,7% (n=30) com 1 a 10 embriões por explante.

O desenvolvimento de raízes adventícias foi observado nos meios sem fitoreguladores (D1 a D3) e também no meio D6, que continha ANA, onde apareciam em maior número (Fig. 5.5B).

De uma forma geral, o aparecimento de calo não embriogénico foi um factor comum a todos os meios sendo a sua maior produção visualizada nos meios D6 a D8 e D3. Nos meios em que a concentração de sacarose foi duplicada (D2 e D4), a produção deste tecido foi menor, relativamente aos meios com apenas 3% de sacarose. Com o avançar do tempo, e após a subcultura, este tecido fenolizava acentuadamente (Fig.s 5.5A – 5.5D).

O comportamento dos explantes colocados no escuro foi muito semelhante, para todos os meios testados, ao descrito na Tabela 5.4 para aqueles que foram colocados à luz. A maior diferença foi verificada na cor geral dos explantes. Enquanto em presença de luz os explantes tinham um tom esverdeado, principalmente nos meios sem reguladores de crescimento ou com citocinina, no escuro a cor geral dos explantes era amarela.

Dois ensaios preliminares foram ainda efectuados numa tentativa de obtenção de embriões somáticos noutras fases que não a globular.

Na primeira dessas tentativas, amostras com embriões globulares foram separadas do resto do explante e estes foram "feridos" com uma lâmina de bisturi e colocados em meio base de MS (de constituição semelhante à dos meios acima citados) com 3% de sacarose. A intenção deste ensaio era provocar o fenómeno de embriogénese secundária, conseguindo-se assim novos embriões que, possivelmente, poderiam evoluir evidenciando as diferentes fases da sua ontogénese. Este resultado não foi atingido. Nos explantes

feridos apenas se formou calo não embriogénico que rapidamente ficou castanho e não se deu qualquer outro tipo de evolução.

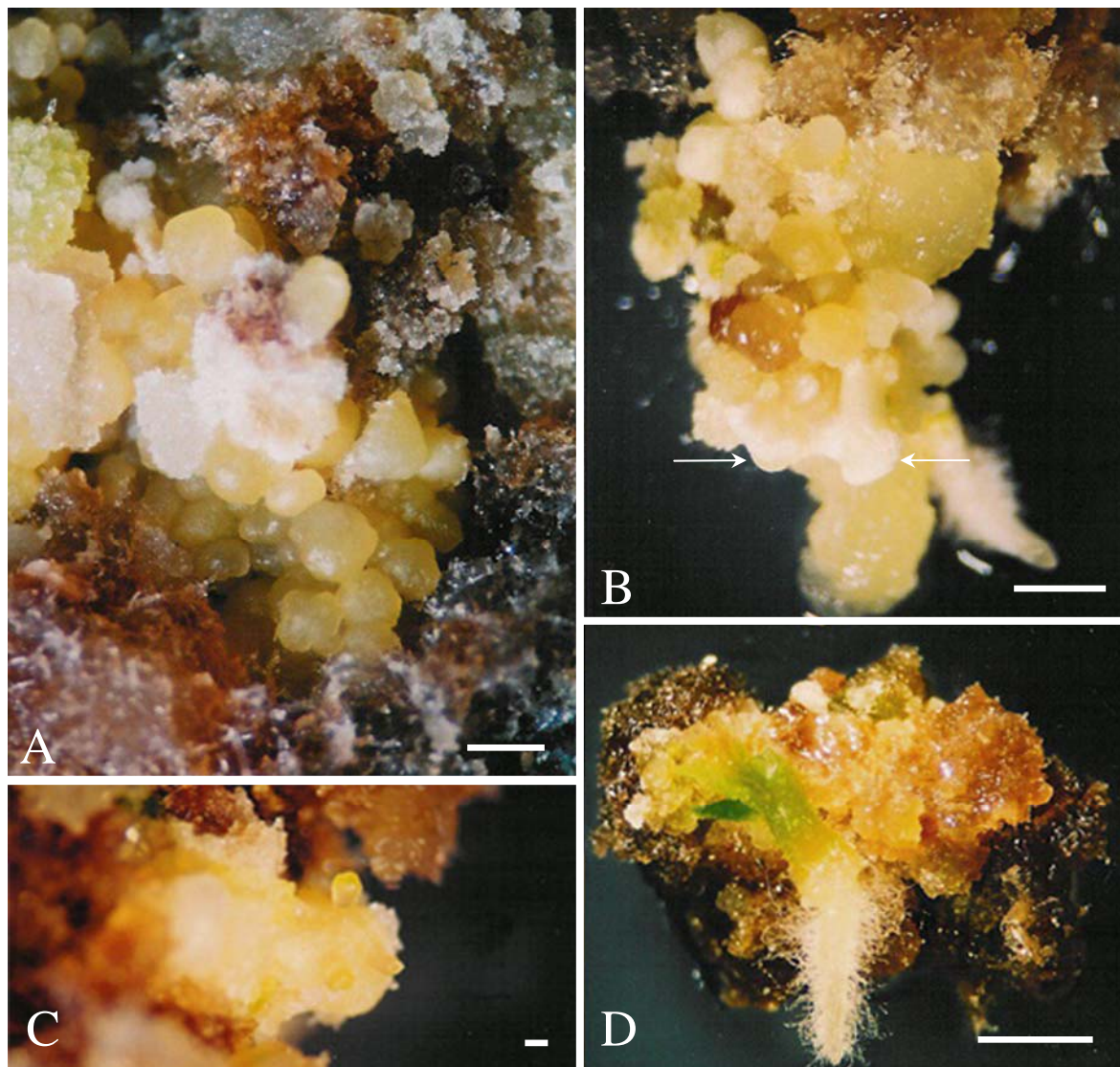


Figura 5.5 Resultados obtidos nos meios testados na histodiferenciação dos embriões globulares. (A) Intumescimento dos embriões globulares e consequente obtenção “de massas compactas” em meio MS com 3% de sacarose (D3) (a barra vale 1,3 mm). (B) Transformação dos embriões globulares em tecido espumoso (setas) e formação de raízes adventícias no meio D3 (a barra vale 1,1 mm). (C) Observação de 3 embriões secundários anómalos formados sobre um embrião globular que se transformou em tecido espumoso no meio com 0,5 μ M ANA (D6) (a barra vale 409 μ m). (D) Embrião precocemente germinado (e.p.g.) formado num explante no meio MS com 3% de sacarose (D3) (a barra vale 1,7 mm).

Num segundo ensaio, explantes com embriões globulares foram colocados em dois meios de MS (com a constituição referida para os meios acima citados) um deles só com ABA e o outro com ABA e PEG 4000. No meio com ABA e sem osmótico verificou-se uma acentuada fenolização dos explantes. No meio com ABA e osmótico visualizaram-se

embriões, nas fases globular e cotilédonar, brancos, opacos e volumosos (Fig. 5.6A), muito mais fáceis de manusear que os embriões globulares translúcidos que tinham sido subcultivados para este meio. Este ensaio forneceu assim um resultado preliminar positivo e promissor no alcance do objectivo pretendido.

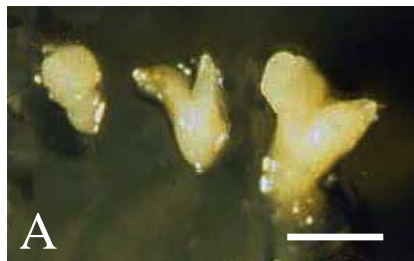


Figura 5.6 (A) Histodiferenciação de embriões globulares em meio com ABA e PEG 4000. Notar o aumento de volume e a opacidade do embrião globular relativamente aos embriões globulares translúcidos apresentados na Figura 5.4A (a barra vale 1200 μm).

5.3.4 Obtenção de embriões somáticos precocemente germinados

A transferência de calo embriogénico para meio base de MS desencadeou o aparecimento de embriões somáticos precocemente germinados (e.p.g.s). Como já anteriormente referido, na secção de histodiferenciação dos embriões globulares, no calo embriogénico surgiram estruturas que se designaram como embriões precocemente germinados (e.p.g.s), porque possuíam dois cotilédones verdes que se assemelhavam a pequenas folhas carnudas (Fig.s 5.7A e 5.11B). Apesar da sua morfologia, estes embriões não poderiam ser confundidos com rebentos formados por organogénese indirecta porque se apresentavam como estruturas bipolares possuindo, para além dos cotilédones, uma raiz bem desenvolvida. Para além disso, destacavam-se facilmente do resto do explante mostrando uma fraca ligação com aquele. Em suma, este tipo de embrião mostrava ser constituído por dois cotilédones verdes de pequena dimensão (que se assemelhavam a folhas carnudas e que mostravam tricomas), uma raiz longa e, a maior parte das vezes, um hipocótilo muito curto.

Após a transferência para meio basal, sobre o calo embriogénico formou-se inicialmente calo não embriogénico. Mais uma vez, este calo não embriogénico apresentava fenolização que se acentuava com o decorrer do tempo de subcultura. No meio deste segundo calo, surgiram os e.p.g.s que, em alguns casos, mostravam apenas os cotilédones verdes porque a raiz se encontrava escondida no calo não embriogénico.

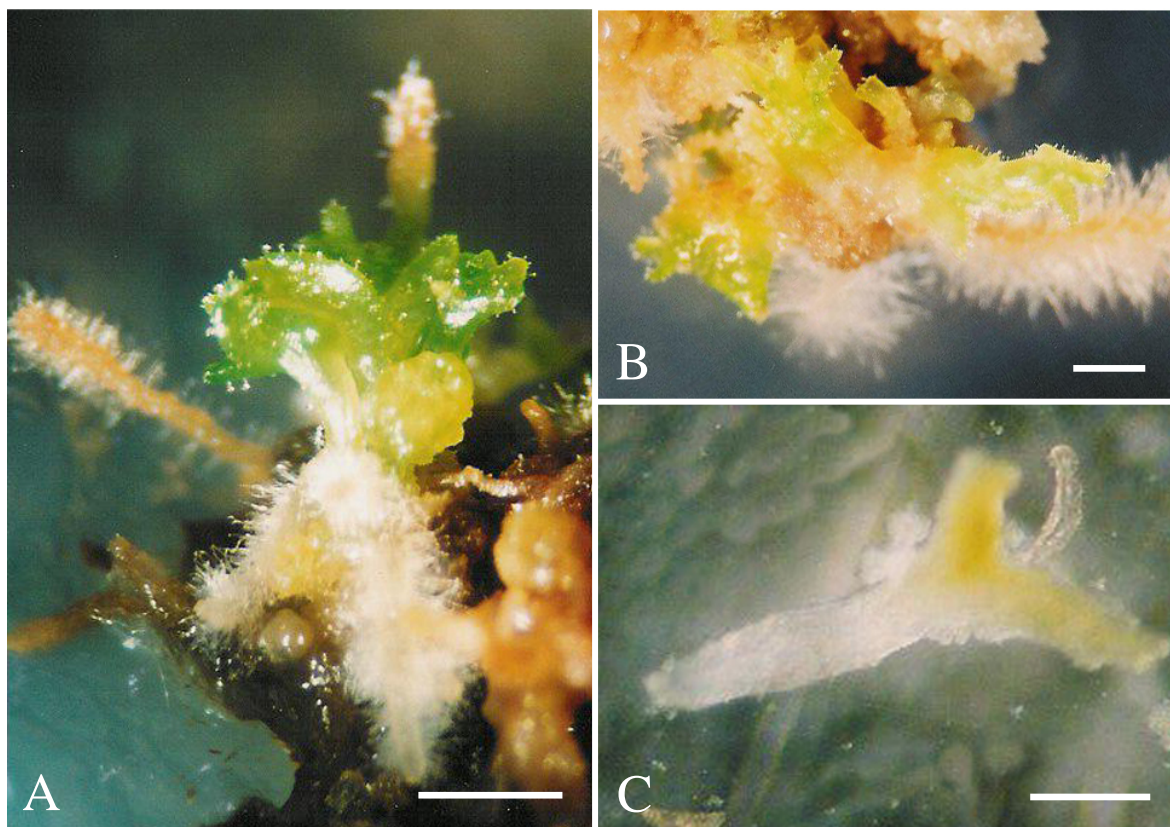


Figura 5.7 Observação de embriões precocemente germinados (e.p.g.s) em meio basal de MS com 3% de sacarose. (A) E.p.g.s que mostram dois cotilédones verdes e uma raiz desenvolvida, quatro semanas após a transferência para meio basal de MS com 3% de sacarose (a barra vale 1,6 mm). (B) Vários e.p.g.s que surgem muito agregados entre si (a barra vale 0,7 mm). (C) Um embrião, que foi separado do grupo anterior, que possui dois cotilédones ainda pequenos e a raiz em alongamento (a barra vale 0,3 mm).

Estes surgiram algumas vezes isolados (Fig. 5.7A) mas, com maior frequência, apareceram em grupos muito colados uns aos outros (Fig. 5.7B). Por observação independente dos embriões pertencentes a esses grupos, e dos que surgiram isolados, foi possível verificar que existia continuidade entre o cotilédone e a raiz daqueles e que estes se separavam muito facilmente do tecido adjacente (Fig. 5.7C).

A percentagem de explantes fornecedores deste tipo de embrião, foi determinada quatro semanas após a sua repicagem para meio base, sendo os ensaios realizados à luz e na obscuridade. Quando o calo foi mantido na obscuridade, essa percentagem foi de 1,3% (n=80). Mas, em presença de luz, a percentagem foi de 5,2% (n=58). Uma vez que na presença de luz os resultados iniciais da transferência de calo embriogênico para meio base foram superiores aos obtidos na obscuridade, o resto do procedimento foi sempre realizado à luz.

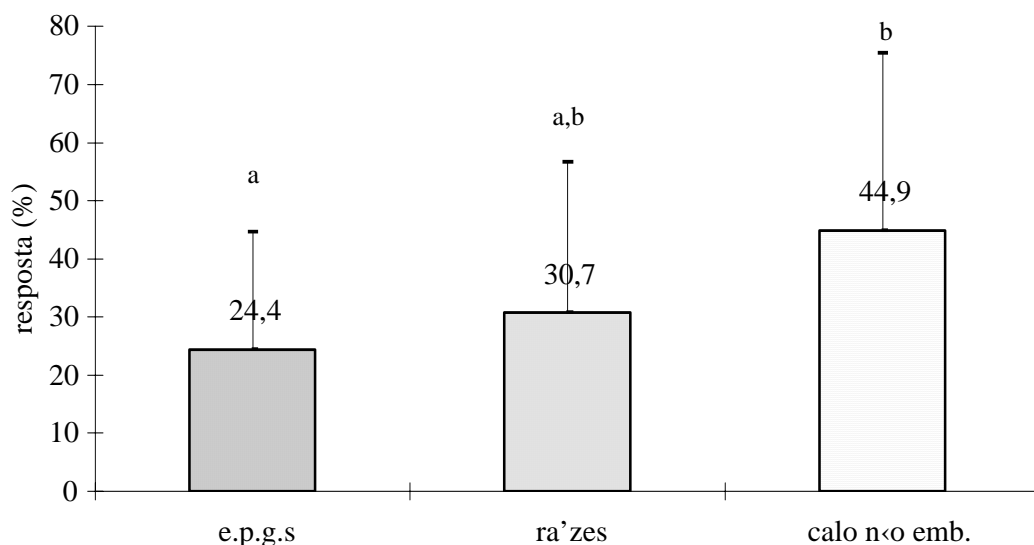


Gráfico 5.4 Gráfico que apresenta a resposta, em termos percentuais, à segunda transferência dos calos para meio basal de MS com 3% de sacarose. Cada valor é a média \pm o desvio padrão de dois ensaios de 18 réplicas com 4 a 6 explantes cada, perfazendo um total de 82 explantes. Os valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$); e.p.g.s – % de calos com embriões precocemente germinados; raízes – % de calos que produziram raízes adventícias; calo não emb. – % de calos que apenas proliferaram calo não embriogénico.

Numa tentativa de amplificação destes resultados, dado que a frequência de regeneração de e.p.g.s era muito baixa, os calos foram novamente subcultivados para meio base para determinar se estes ainda possuíam capacidade de produção de mais embriões deste tipo. O Gráfico 5.4 apresenta os resultados desta transferência. Com este procedimento, 24,4% dos explantes produziram e.p.g.s com um número médio por explante produtor igual a 7,6 ($\pm 3,6$; $n = 21$). Os explantes que não expressaram a produção de e.p.g.s apenas diferenciaram raízes adventícias (30,7%) e, naqueles que não mostraram nenhuma destas formações, houve apenas proliferação do calo não embriogénico (44,9%).

Tabela 5.5 Número de embriões precocemente germinados (e.p.g.s) e de raízes adventícias (raízes adv.s) produzidos por explante, após a segunda transferência para meio base de MS com 3% de sacarose. Resultados respeitantes a 8 das réplicas utilizadas.

Nº expl.s dado por cada calo		Explantos produtores e.p.g.s	N.º e.p.g.s / explante produtor	Explantos produtores raízes adv.s	N.º raízes / explante produtor	Explantos apenas com proliferação calo não emb.
(c ₁)	5	3	>10+>10+>10	0	-	2
(c ₂)	6	3	>10+>10+3	2	1+1	1
(c ₃)	6	2	>10+>10	0	-	4
(c ₄)	4	2	>10+6	2	4+1	0
(c ₅)	4	1	>10	2	>10+2	1
(c ₆)	4	1	>10	3	>10+1+1	0
(c ₇)	4	1	3	2	3+2	1
(c ₈)	4	0	-	3	2+1+1	1
Total	37	13	Min. = 112	14	Min. = 40	10

>10 – número superior a 10 mas, difícil de determinar com exactidão;

Na Tabela 5.5 apresenta-se a quantificação realizada em oito das réplicas usadas nos ensaios, que evidencia bem a diversidade de resultados obtida por cada explante subcultivado. Como se pode verificar pela análise dessa tabela, e como já foi referido anteriormente, estes embriões surgiram, com maior frequência, em grupos cujo número era difícil de determinar dado estes se encontrarem muito juntos. Foi esta a situação dos explantes que na Tabela 5.5 apresentam >10 nesse parâmetro. Num cálculo por defeito, a produção a partir deste grupo de calos foi de 112 embriões precocemente germinados.

5.3.4.1 Obtenção de e.p.g.s em calo embriogénico subcultivado em meio líquido

Num ensaio de suspensões celulares de calo embriogénico mantido durante quatro meses no meio de indução I6 foram também obtidos e.p.g.s. As suspensões celulares foram agitadas durante três semanas e, após esse período, um pequeno volume de suspensão, com agregados celulares, foi colocado sobre um círculo de papel de filtro, que anteriormente já tinha sido colado à superfície de placas com meio base de MS com 3% de sacarose. Cerca de três semanas mais tarde, passaram a ser visíveis raízes e pequenos grupos de e.p.g.s que

surgiram em emaranhados sobre os agregados de células que, entretanto, tinham proliferado (Fig. 5.8A).

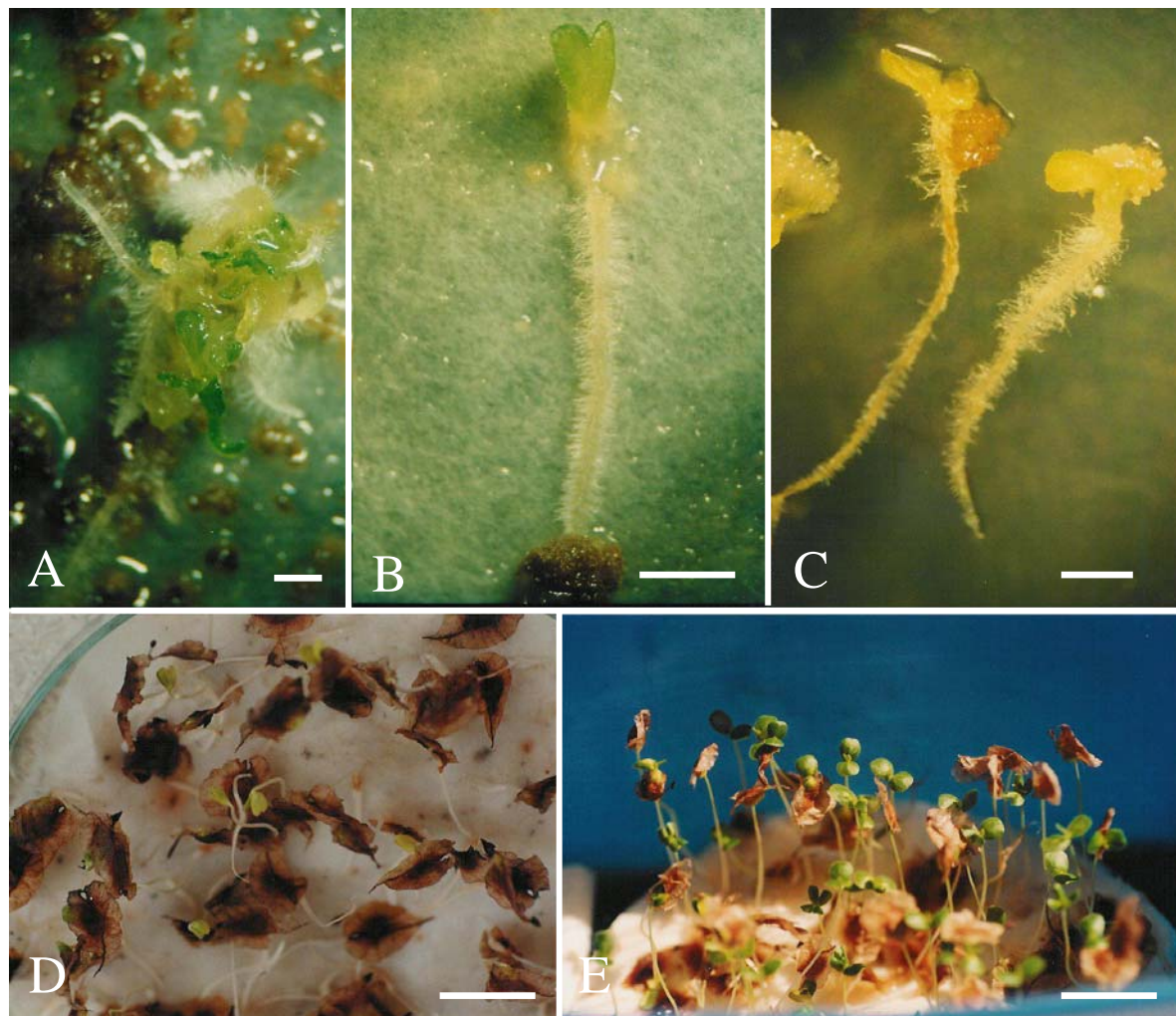


Figura 5.8 Observação de embriões precocemente germinados (e.p.g.s) em calo embriogênico subcultivado em meio líquido basal de MS com 3% de sacarose. (A) Grupo de e.p.g.s formados sobre um agregado celular, após nova transferência para meio sólido, que possuem dois pequenos cotilédones verdes e raízes muito alongadas (a barra vale 0,9 mm). (B) E.p.g. com uma raiz longa e um só cotilédone que se mostra muito semelhante aos cotilédones das sementes logo após a germinação (Fig. 5.8D) (a barra vale 1,7 mm). (C) Dois e.p.g.s que, embora possuam o segundo cotilédone incompleto, mostram grandes semelhanças com os cotilédones das plântulas, uma semana após a germinação (Fig. 5.8E) (a barra vale 1,3 mm). (D) Sementes em germinação (a barra vale 2 cm). (E) Plântulas observadas uma semana após a germinação. Notar a presença do hipocótilo que nos e.p.g.s é raramente observado (a barra vale 2 cm).

Embora os embriões surgissem, com maior frequência, em grupos como o apresentado na Figura 5.8A, por vezes, estes também apareceram isolados como descrito para o calo embriogênico que permaneceu sempre em meio sólido. Foi neste ensaio que os e.p.g.s se mostraram mais semelhantes às plântulas resultantes da germinação de sementes.

O cotilédone único do e.p.g. da Figura 5.8B apresentava uma semelhança notória com os cotilédones das sementes, logo a seguir à germinação (Fig. 5.8D). Na Figura 5.8C observa-se que, embora os embriões somáticos não apresentassem o segundo cotilédone completo, o existente era muito semelhante aos que as plântulas exibiam, alguns dias após a germinação (Fig. 5.8E). A maior diferença entre estas duas estruturas residia no facto de o hipocótilo dos e.p.g.s ser muito pequeno.

5.3.4.2 Conversão dos embriões precocemente germinados

A separação dos e.p.g.s do resto do explante não foi difícil, mas o seu manuseamento teve de ser realizado com extremo cuidado e rapidez devido à sua fragilidade e ao ambiente desidratado, próprio das câmaras de fluxo laminar.

Para estes ensaios foram seleccionados e.p.g.s tipo, com dois cotilédones bem formados. Dois meios com redução da concentração salina e da fonte de carbono foram usados na determinação da melhor taxa de conversão. Os meios testados foram meios base de MS com metade da concentração salina e com 1% (C1) e 2% (C2) de sacarose (Gráfico 5.5).

Os resultados obtidos com estes meios estão ilustrados no Gráfico 5.5. A percentagem de embriões que não sobreviveram após esta transferência não foi significativamente diferente entre os dois meios e mais de metade dos embriões transferidos, para ambos os meios, não conseguiram sobreviver a este procedimento (61,0% em C1 e 54,3% em C2).

Os embriões sobreviventes exibiram dois tipos de resposta. Enquanto alguns embriões foram convertidos em plantas, outros proliferaram dando origem a novos embriões. Embora se tenham verificado os dois tipos de resposta, em ambos os meios testados, o meio C2 mostrou possuir uma percentagem de embriões em proliferação significativamente superior à observada em C1 (Gráfico 5.5: 39,4% em C2 contra 24,1% em C1).

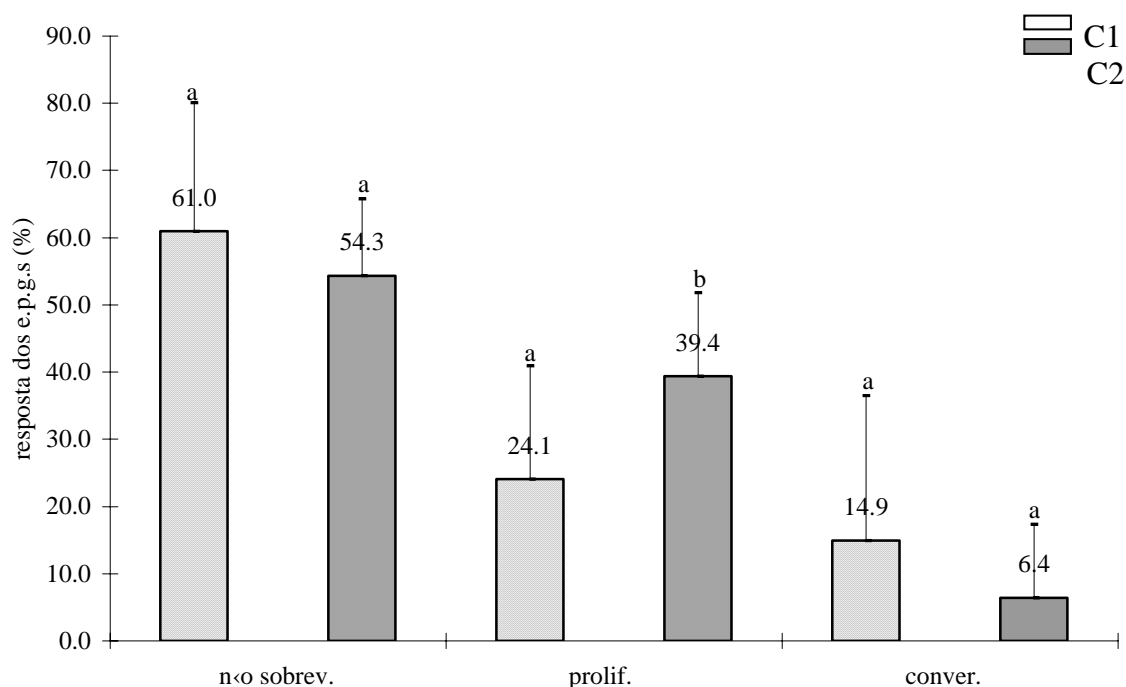


Gráfico 5.5 Resposta (expressa em %) dos e.p.g.s aos meios de conversão C1 e C2. Os resultados foram quantificados 6 semanas após a subcultura para estes meios em duas experimentações. Os valores são a média \pm o desvio padrão (linhas verticais) de 13 réplicas em C1 e 11 réplicas em C2, cada uma com 3 a 5 embriões perfazendo um número total de 52 embriões em C1 e 44 embriões em C2. Os valores acompanhados de letra diferente, na mesma categoria do eixo do x, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$); não sobrev. - % de e.p.g.s que não sobreviveram; prolif. - % de e.p.g.s que proliferaram dando origem a novos embriões; conver. - % de e.p.g.s que foram convertidos em plantas.

Dados estes resultados, e a observação de que os embriões mais pequenos e mais volumosos proliferavam dando origem a novos embriões, enquanto os embriões mais altos e com menor superfície de contacto com o meio de cultura se convertiam mais facilmente em plantas, uma nova estratégia foi adoptada. Os embriões foram separados, na altura da transferência, sendo os mais volumosos transferidos para o meio C2, para a sua proliferação, e os mais longos transferidos para o meio C1 para a sua conversão em plantas. Numa amostra de 38 embriões, repicados para o meio de conversão nas condições acima descritas, a percentagem de conversão no meio C1 passou para 35,9%, um valor estatisticamente diferente do atingido inicialmente neste meio (Gráfico 5.5: 14,9%). Nestas condições, seis semanas após a transferência algumas das plantas atingiam já cerca de 5 cm de altura (Fig. 5.9A e 5.9B).

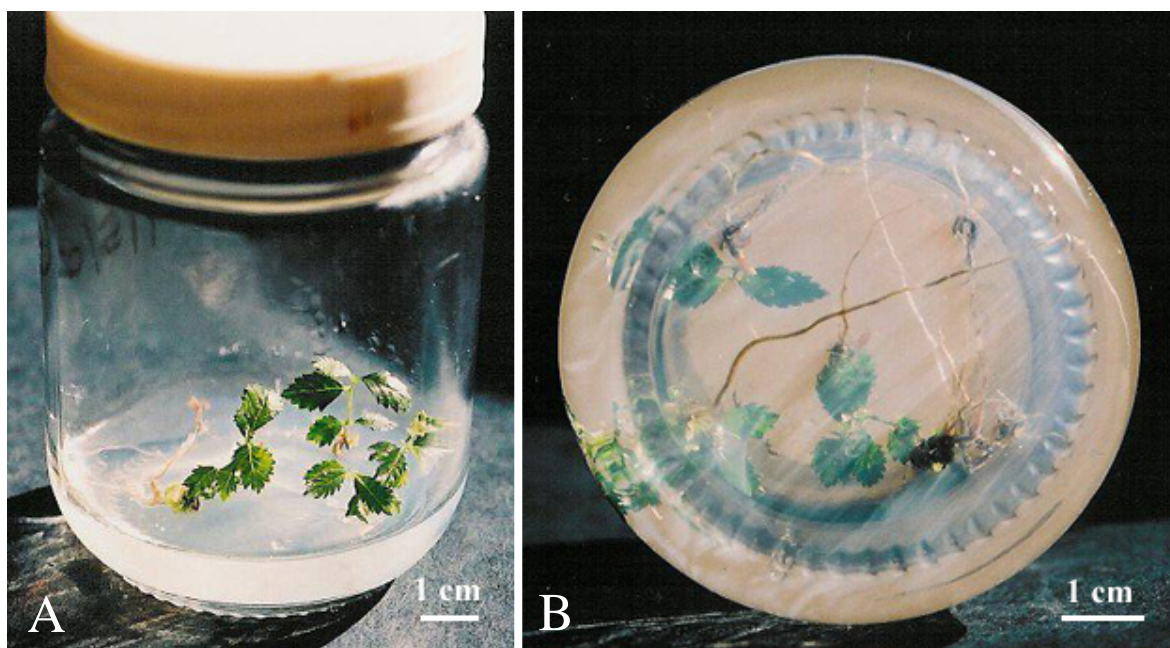


Figura 5.9 Conversão dos embriões precocemente germinados (e.p.g.s) em plantas. (A) Plantas provenientes de e.p.g.s, após 6 semanas no meio de conversão C1 (1/2 MS basal com 1% de sacarose). (B) Fotografia da base do frasco que mostra o alongamento e espessamento das raízes.

5.3.4.3 Aclimatização de plantas obtidas de embriões precocemente germinados

As plantas obtidas no meio de conversão C1 permaneceram nesse meio até que o caule ficasse ligeiramente mais espesso e as folhas com uma cutícula mais grossa, de forma a melhor resistirem ao processo de aclimatização. O período necessário para atingir este estado de desenvolvimento chegava a alcançar os três meses. Naquele estado, a probabilidade de sobrevivência das plantas era maior dado que estas se tornavam mais resistentes a um ambiente com menor percentagem de humidade relativa e a possíveis contaminações.

Para o ensaio de aclimatização escolheu-se para controlo um lote de plantas micropropagadas no meio DKW1, que a nível morfológico fosse muito semelhante ao lote de plantas obtido a partir de embriões somáticos. A percentagem de plantas provenientes de embriões, sobreviventes ao processo de aclimatização, após três meses, foi de 39,7% ($\pm 4,6$ n=18) sendo esta percentagem estatisticamente semelhante à das plantas controlo 37,5% ($\pm 5,9$ n=24). Ao nível morfológico não se verificaram diferenças entre o grupo de

plantas obtidas de embriões e o das plantas controle, sendo ambos os grupos semelhantes à planta-mãe. Na Figura 5.10A são apresentadas duas plantas representativas de cada um dos grupos, fotografadas cinco meses após o início do processo de aclimatização. Pela observação da figura pode-se constatar que ao nível da morfologia da folha, diâmetro do caule e altura das plantas não existiam diferenças.



Figura 5.10 (A) Plantas fotografadas cinco meses após a transferência para o substrato, representativas de cada um dos grupos sujeitos ao processo de aclimatização. A planta da direita foi obtida a partir de um embrião precocemente germinado e a da esquerda foi obtida da cultura de segmentos nodais da planta mãe (as plantas têm de altura cerca de 13 cm).

5.3.4.4 Observação da morfologia dos embriões precocemente germinados

Os e.p.g.s apresentavam um padrão morfológico que se expressava pela existência de dois cotilédones verdes e de uma raiz longa, que eram características fixas. A maior parte destes embriões não apresentavam hipocótilo ou, então, este era muito reduzido. Entre os embriões com aquelas características, os cotilédones observados tinham diferentes formas. Estes podiam ser muito semelhantes aos que se observam nas plântulas logo após a

germinação das sementes (Fig. 5.8C), ou então podiam assemelhar-se a folhas que possuíam mais ou menos recortes (Fig. 5.5D e Fig. 5.7A). A Figura 5.11A apresenta um dos casos em que os cotilédones eram pequenos e pouco recortados e a Figura 5.11B apresenta um dos casos extremos em que os cotilédones pareciam folhas “carnudas” de ulmeiro. A Figura 5.11B apresenta uma folha de ulmeiro para que a morfologia das duas estruturas possa ser comparada.

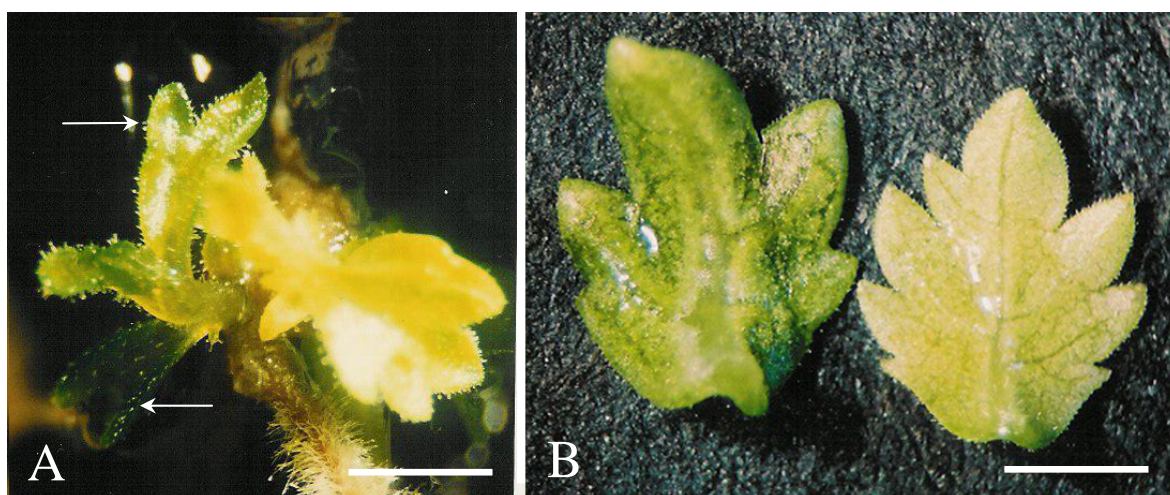


Figura 5.11 (A) Pequena planta proveniente de um embrião precocemente germinado (e.p.g.), em que ainda são visíveis os cotilédones (setas) que, neste caso, possuem poucos septos. (B) Comparação da morfologia de um cotilédone de um e.p.g. (esquerda) com a de uma folha (direita). Embora, morfologicamente, sejam semelhantes, o cotilédone possui uma nervura central mais grossa e um menor número de septos do que a folhas (as barras valem 1,7 mm).

Para além dos e.p.g.s com dois cotilédones verdes de diferentes formatos foram também observados e.p.g.s com anormal morfologia. Entre os embriões com morfologia anormal observaram-se embriões com os cotilédones fundidos num só ou então vários embriões fundidos entre si formando fascículos (embriões fasciculados) como no caso dos apresentados na Figura 5.12A. Noutros casos, observaram-se embriões com os cotilédones em forma de taça ou trombeta como o exemplo da Figura 5.12B. Observaram-se também casos de embriões com mais de dois cotilédones e outros com apenas um cotilédone. São exemplos destas situações os embriões da Figura 5.12C que possui três cotilédones e o da Figura 5.12D que possui apenas um cotilédone. Contrariamente ao observado com os e.p.g.s de normal morfologia, acima descritos, a partir dos e.p.g.s de anormal morfologia não foram obtidas plantas.

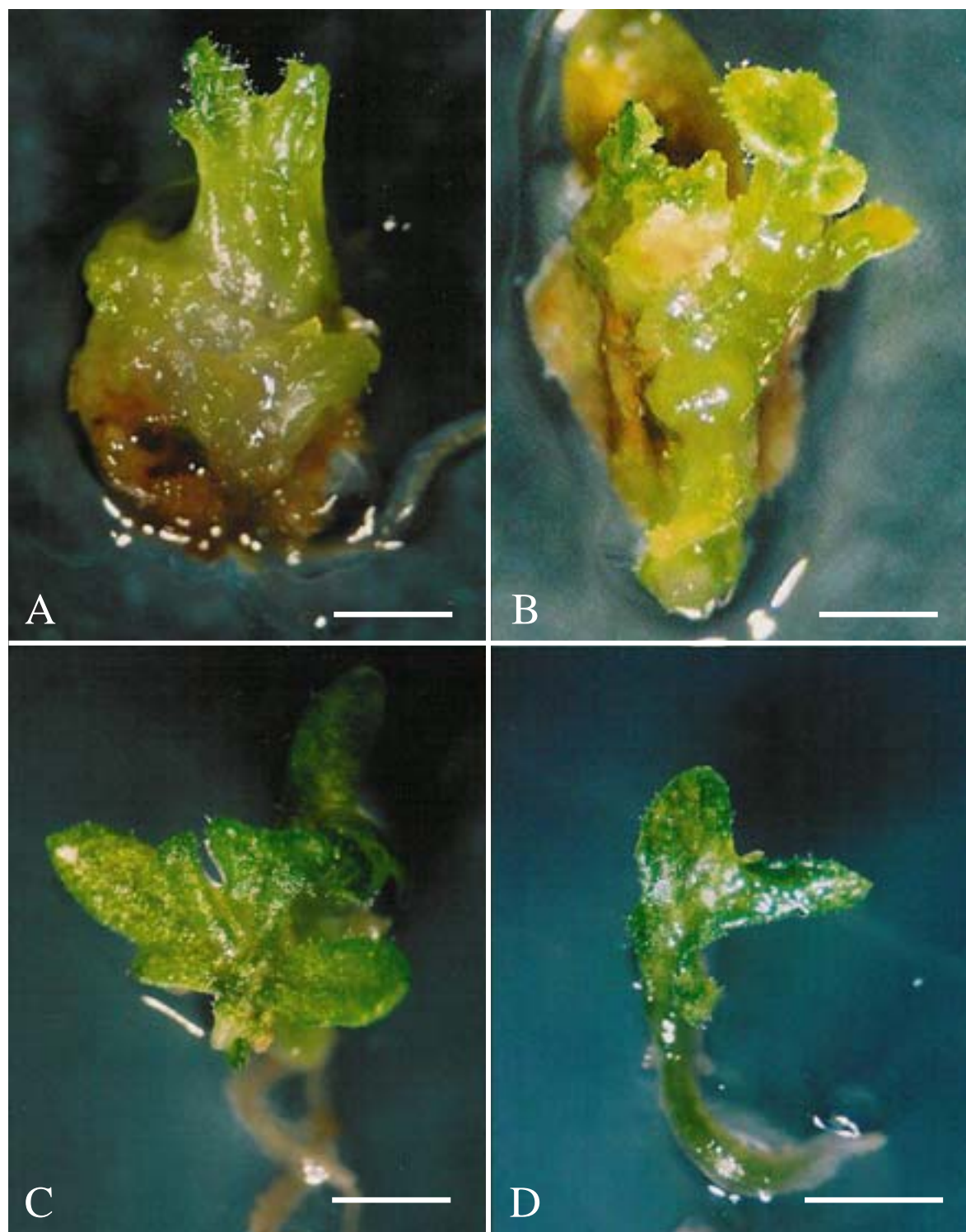


Figura 5.12 Embriões precocemente germinados de morfologia anormal. (A) Fusão de vários embriões num só em forma de feixe (embriões fasciculados) (a barra vale 1,6 mm). (B) Embriões com cotilédones em forma de taça ou trombeta (a barra vale 1,0 mm). (C) Embrião com mais de dois cotilédones (a barra vale 1,2 mm). (D) Embrião com apenas um cotilédone (a barra vale 1,5 mm).

5.3.5 Embriogénese repetitiva em embriões precocemente germinados

5.3.5.1 Tipos de embriogénese repetitiva obtida a partir de e.p.g.s

Uma vez que os e.p.g.s de morfologia anormal não se convertiam em plantas, testou-se a sua utilização como fonte de material em ensaios de embriogénese repetitiva conduzidos em meio base de MS.

Estes foram então subcultivados, ferindo-os ligeiramente com a lâmina do bisturi, e colocando, o mais possível, a sua superfície em contacto com o meio de cultura (Fig. 5.13A). Devido a este procedimento dois tipos de resultados foram observados: a formação indirecta de embriões somáticos em calo embriogénico formado *de novo* (Fig. 5.13B) e a formação directa de embriões somáticos, em diferentes fases, sobre cotilédones, hipocótilos ou raízes, sem a intervenção de calo embriogénico (Fig.s 5.13C – 5.13E). Estes acontecimentos ocorreram em simultâneo numa mesma placa, mas a diferentes frequências. O resultado de visualização mais comum foi a produção calo embriogénico formado *de novo* e a produção directa de embriões secundários foi observada de forma esporádica.

Foi a partir do calo embriogénico formado *de novo* e também em embriões secundários de origem directa, que se observaram as diferentes fases da ontogénese dos embriões somáticos de ulmeiro. Os embriões obtidos por embriogénese secundária directa possuíam contornos mais definidos e uma morfologia mais perfeita (Fig.s 5.13C – 5.13E) que os produzidos no calo embriogénico formado *de novo* (Fig. 5.13B). No calo embriogénico formado *de novo* os embriões apareciam muito agrupados sendo, por vezes, difícil distinguir as diferentes fases. Este efeito foi ainda mais pronunciado em meio solidificado com agar purificado do que em meio solidificado com gelrite. Para além disso, no calo embriogénico formado *de novo* foi frequente a visualização de embriões de anormal morfologia, como por exemplo, embriões com os cotilédones fundidos num só (Fig. 5.15C; visualização em M.E.V. Fig. 5.18B). O calo embriogénico formado *de novo* apresentou uma maior sincronia (Fig. 5.15A – 5.15D), na formação de embriões, do que os embriões de origem directa, uma vez que estes podiam ser observados em diferentes fases de desenvolvimento sobre o embrião inicial (Fig. 5.13C e 5.13E).

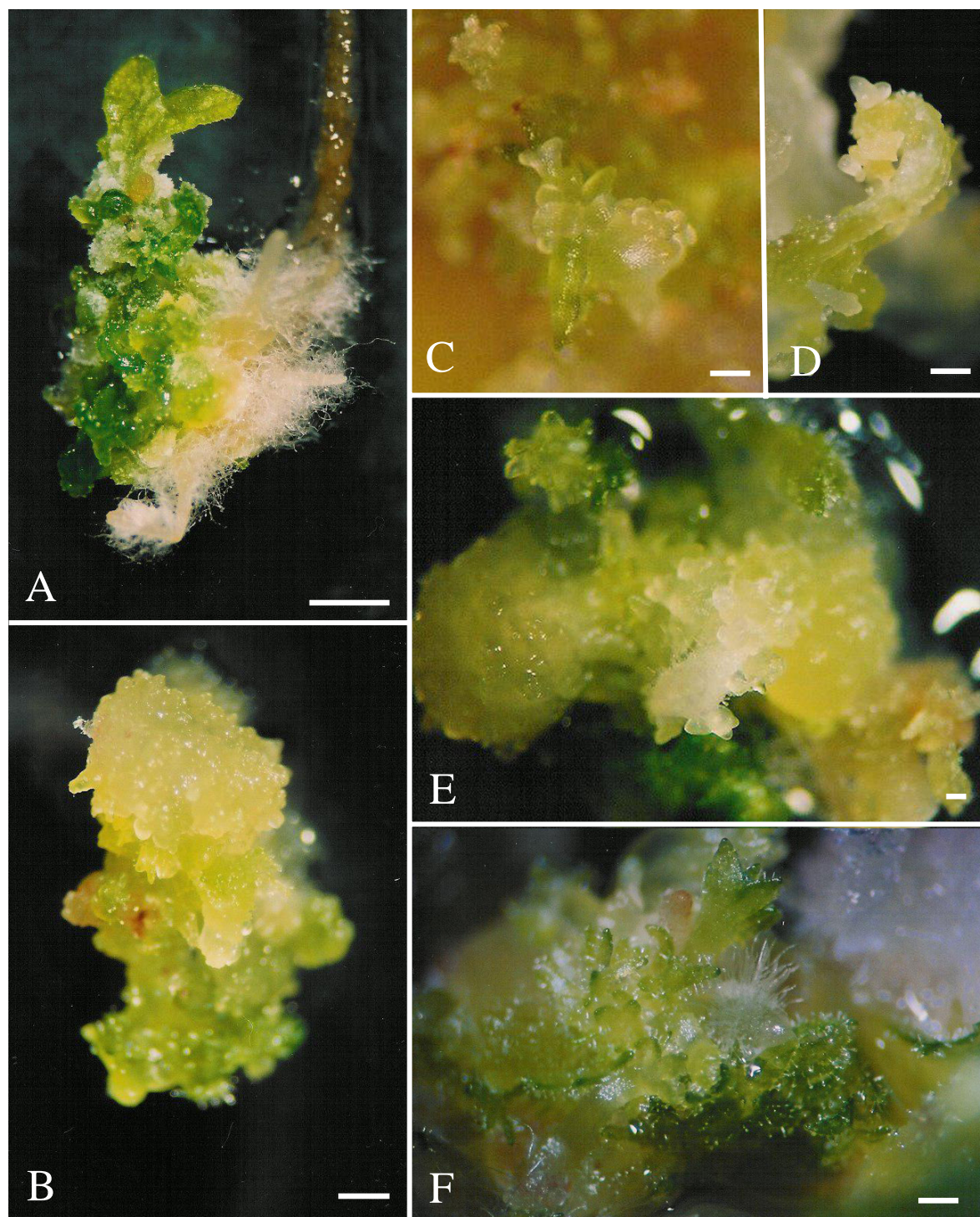


Figura 5.13 Embriogénese repetitiva a partir de embriões precocemente germinados (e.p.g.s) em meio basal de MS. (A) Exemplo de embriogénese repetitiva a partir do embrião apresentado na Figura 5.12D (a barra vale 1,5 mm). (B) Calo embriogénico formado *de novo*, de aspecto nodular, que apresenta essencialmente embriões em fase globular (a barra vale 0,4 mm). (C) Embriões globulares e em fase de torpedo, de origem directa, formados sobre os cotilédones de um e.p.g. (a barra vale 182 μ m). (D) Embriões globular e cotiledonar sobre o hipocótilo de um e.p.g. (a barra vale 273 μ m). (E) Embriões globulares e em coração sobre a raiz de um e.p.g. (a barra vale 136 μ m). (F) Embriões da figura anterior, fotografados vinte dias depois e com sete dias de sujeição à luz (a barra vale 0,3 mm).

5.3.5.2 Embriogénese repetitiva via produção de calo embriogénico formado *de novo*

O calo embriogénico formava-se, aproximadamente, três semanas após a subcultura dos embriões para meio base. Este era um pouco translúcido, de cor amarela muito clara e mostrava desde muito cedo, organização celular. Quando visto em esfregaços com carmim acético mostrava características semelhantes às observadas em esfregaços de calo embriogénico obtido nos meios de indução (ver secção 5.3.1.3 Indução de calo embriogénico e confirmação da natureza do calo). Nestes esfregaços foram, por vezes, visíveis embriões já diferenciados como o apresentado na Figura 5.14A que se encontrava ao lado de um outro numa fase de diferenciação mais avançada. Como já referido para os e.p.g.s, estes embriões também possuíam tricomas que apareciam nas fases mais diferenciadas (Fig. 5.14B; visualização em M.E.V. Fig.s 5.18C e 5.18D).

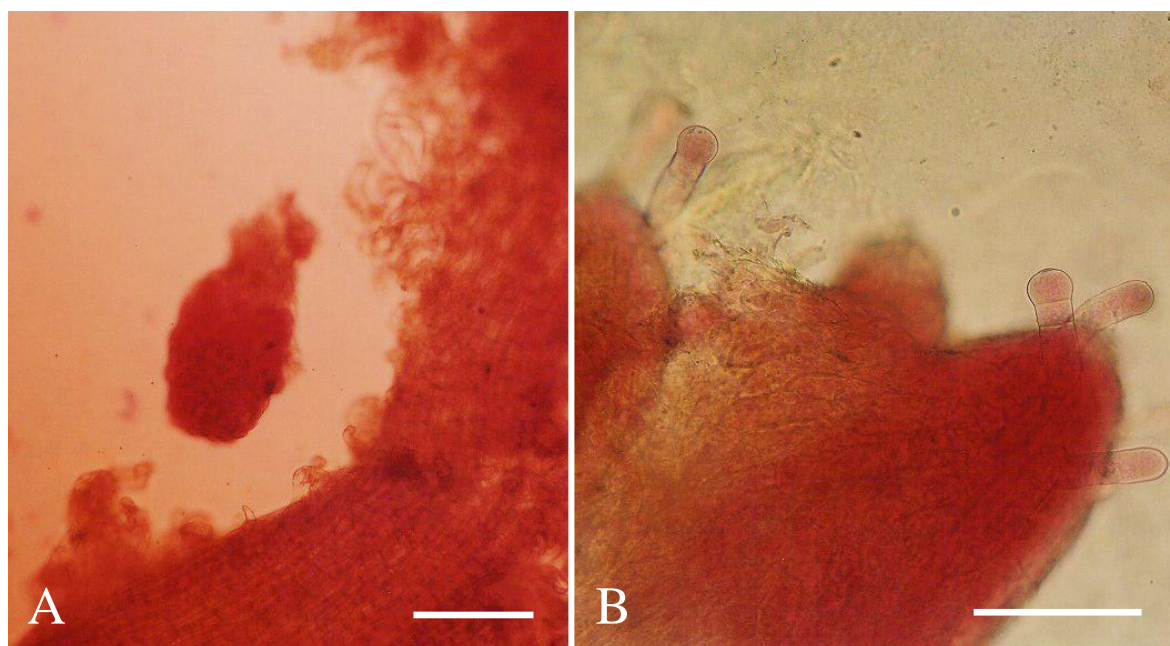


Figura 5.14 Observação de esfregaços de calo embriogénico formado *de novo* em carmim acético. (A) Esfregaço que mostra a presença de embriões estando aqui em evidência um embrião globular ao lado de um outro numa fase de desenvolvimento mais avançada (a barra vale 155 μ m). (B) Observação de tricomas na zona dos cotilédones num embrião em fase de diferenciação avançada (a barra vale 99 μ m).

Inicialmente o calo embriogénico formado *de novo* apresentava a sua superfície sob a forma de imensos nódulos (Fig. 5.15A), embriões globulares muito juntos, que progressivamente iam evoluindo passando pelas diferentes fases da sua diferenciação, alcançando a fase cotilédonar (Fig. 5.15C) na quinta semana após a subcultura.

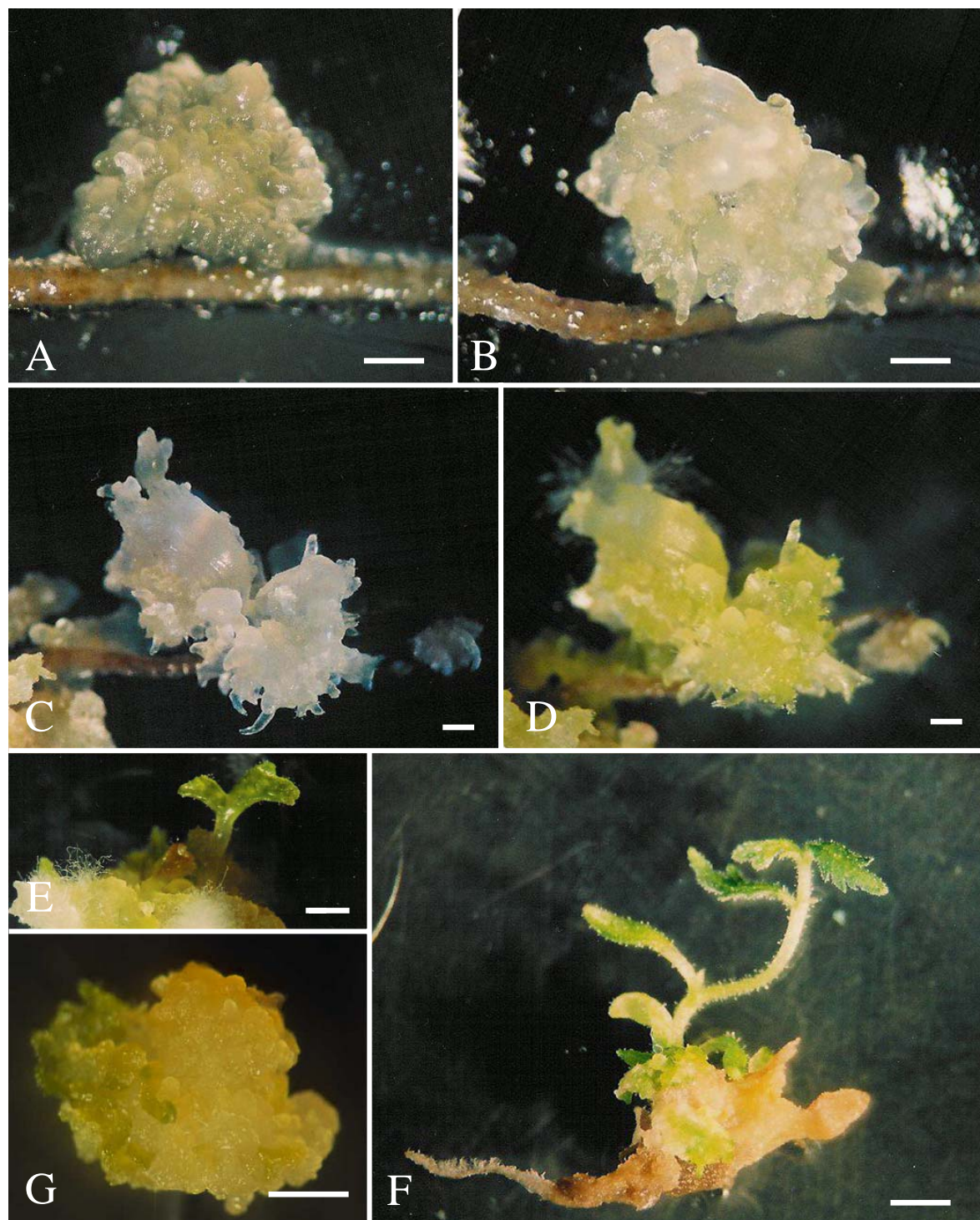


Figura 5.15 Evolução de um explante de calo embriogénico formado *de novo* em meio basal de MS com 3% de sacarose. (A) Calo embriogénico de aspecto nodular que apresentava na sua superfície imensos embriões, muito juntos, em fase globular (a barra vale 300 μ m). (B) Uma semana mais tarde, os embriões já se encontravam num estado mais avançado sendo já visíveis embriões em fase de torpedo (a barra vale 300 μ m). (C) Após outra semana, o explante apresentava já embriões em fase cotiledonar sendo, nesta altura, transferido para a luz (a barra vale 444 μ m). (D) Após transferência para a luz os embriões adquiriram cor verde e o número de tricomas aumentou (a barra vale 444 μ m). (E) Alongamento do hipocótilo e dos cotilédones de um embrião somático (a barra vale 0,8 mm). (F) Obtenção de uma planta completa que foi separada do resto do explante (a barra vale 9 mm). (G) Calo embriogénico que em presença de luz dá origem, num ciclo repetitivo, a novos embriões somáticos e a novo calo embriogénico (a barra vale 1 mm).

Na Figura 5.15 é apresentada uma sequência de quatro fotografias de um mesmo explante, mantido no escuro até à obtenção de embriões cotiledonares, desde a altura em que apresenta apenas embriões globulares até uma semana depois da sujeição à luz (Fig. 5.15^A – 5.15D). A Figura 5.15E é representativa do alongamento do hipocótilo e da expansão dos cotilédones dos embriões neste material e na Figura 5.15F é apresentado um embrião germinado que mostra a raiz, os dois cotilédones e três jovens folhas. Em condições de luminosidade, a par com a diferenciação dos embriões e a conversão em plantas existe, simultaneamente, a proliferação constante do calo embriogénico (Fig. 5.15G). Nestas condições, o calo apresenta uma cor amarela, dourada sendo intercalado por zonas verdes de embriões já formados (Fig. 5.15G). Desde a sua obtenção, o calo embriogénico formado *de novo* foi mantido em cultura durante três anos.

5.3.5.2.1 Germinação e conversão de embriões de calo embriogénico formado *de novo*

Como já referido, a partir do calo embriogénico formado *de novo* obtiveram-se embriões somáticos que mostraram todo o seu processo de diferenciação e que germinaram directamente no meio de proliferação. Após a obtenção dos embriões em fase cotiledonar os cotilédones expandiam, esverdeavam e mostravam um acentuado número de tricomas, sendo acompanhados pelo alongamento da raiz e do hipocótilo (Fig. 5.15E). Logo após este desenvolvimento formavam-se as primeiras folhas (Fig. 5.15F). Pequenos grupos de plantas, nestas condições, foram transferidas para o meio de conversão C1, tendo-se comportado como os e.p.g.s. As pequenas plantas tinham características de crescimento semelhantes às observadas nas plantas obtidas a partir de e.p.g.s (Fig. 5.9A), não havendo variação ao nível da morfologia e tamanho da folha, espessura e alongamento do caule e das raízes.

5.3.5.2.2 Determinação do nº de embriões em calo embriogénico formado *de novo*

Em ensaios de transferência de explantes de calo embriogénico formado *de novo* para novo meio base de MS com 3% de sacarose obtiveram-se, seis semanas após a

subcultura, 592 embriões com cotilédones verdes (contagem feita uma semana depois de serem transferidos para a luz). A percentagem de explantes formadores de embriões somáticos foi de 78,1% ($\pm 19,8$) (64 explantes), com uma média do número de embriões por explante igual a 9,3 ($\pm 5,1$) e uma média do número de embriões por explante formador igual a 11,5 ($\pm 4,0$). Tendo cada um dos explantes transferidos cerca de 0,022 g, a estimativa do número médio de embriões por grama deste calo atingiu o valor de 423 embriões somáticos.

5.3.6 Microscopia electrónica de varrimento

5.3.6.1 Observação de embriões globulares formados no meio de indução I6

Na Figura 5.16A podem-se observar embriões globulares formados a partir de calo embriogénico induzido no meio I6. Nessa figura encontram-se embriões globulares de diferentes tamanhos, mais ou menos isolados, mas também um embrião de morfologia anormal que apresenta apenas um primórdio de cotilédone. Na periferia do explante observam-se células alongadas, sem qualquer tipo de organização, que são características de calo não embriogénico e no centro existe uma zona de calo embriogénico. Na Figura 5.16B é apresentado um embrião somático em fase cordiforme que aparece de forma esporádica entre os embriões globulares.

Após subcultura dos explantes produtores dos primeiros embriões globulares, a partir do calo embriogénico surgiram novos embriões globulares em grande número. Na Figura 5.16C é apresentada uma visão geral de um explante com pequenos embriões globulares de produção recente e, na Figura 5.16D, esses embriões podem ser observados em pormenor.

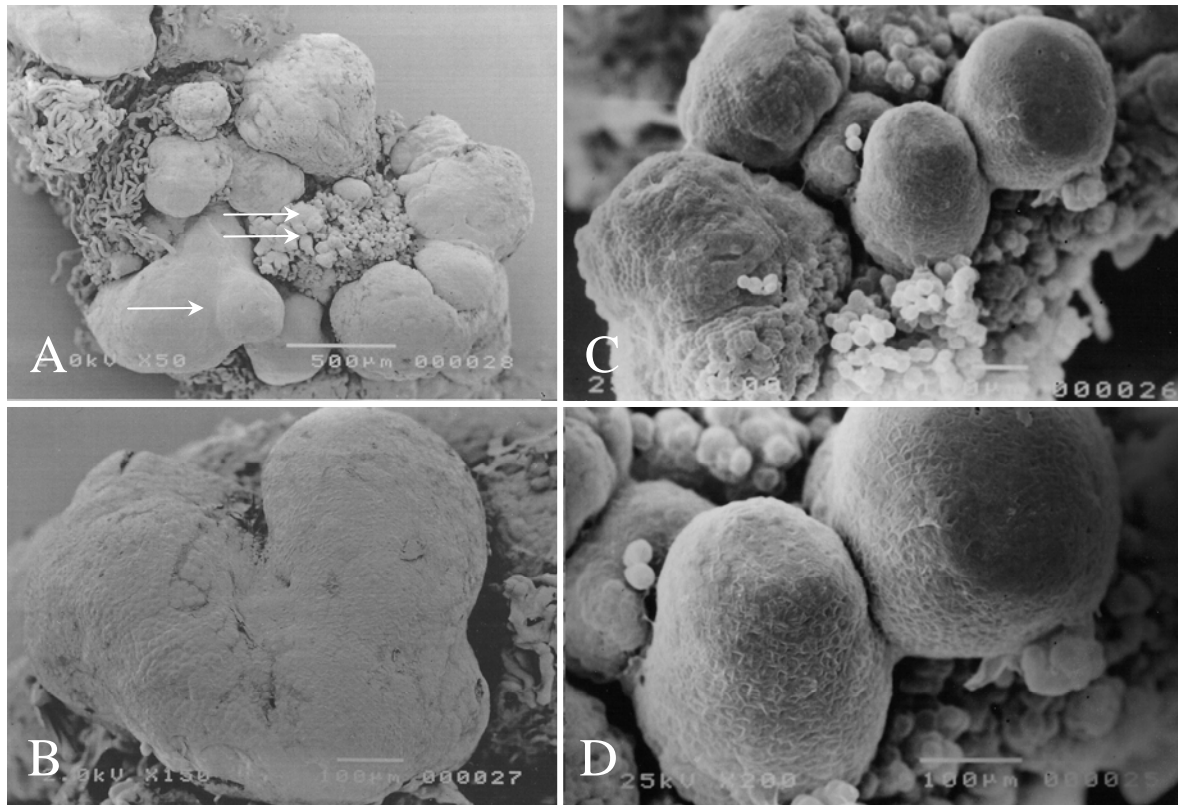


Figura 5.16 Produção de embriões globulares no meio de indução I6. (A) Embriões globulares produzidos após cinco meses de indução. Notar a existência de embriões globulares de diferente dimensão e a existência de um embrião anormal que possui apenas um primórdio de cotilédone (seta). No centro do material existe uma zona de calo embriogénico caracterizado por possuir células pequenas e isodiamétricas (dupla seta) e na periferia deste observam-se células muito longas de calo não embriogénico. (B) Embrião cordiforme que surge de forma muito esporádica entre os embriões globulares. (C) Novos embriões globulares obtidos após subcultura dos explantes produtores dos primeiros embriões globulares. (D) Pormenor dos embriões globulares da fotografia anterior (estas duas últimas microfotografias foram obtidas a partir do explante apresentado na Figura 5.4B).

5.3.6.2 Exemplos de embriogénese repetitiva em e.p.g.s de anormal morfologia

Na Figura 5.17A observa-se um grupo de e.p.g.s que mostram uma grande superfície de ligação uns com os outros. Na Figura 5.17C é apresentada uma das situações de morfologia anormal verificada neste tipo de embrião, a fusão de vários embriões num só. Os e.p.g.s de anormal morfologia não formaram plantas mas deram origem a novos embriões somáticos pelo fenómeno de embriogénese repetitiva ou secundária. Um desses casos é ilustrado na Figura 5.17B, onde um embrião naquela situação deu origem a novos embriões globulares a partir do hipocótilo. Um outro caso de embriogénese secundária é

apresentado na Microfotografia 5.17D, em que a partir da zona dos cotilédones se formou um novo grupo de embriões.

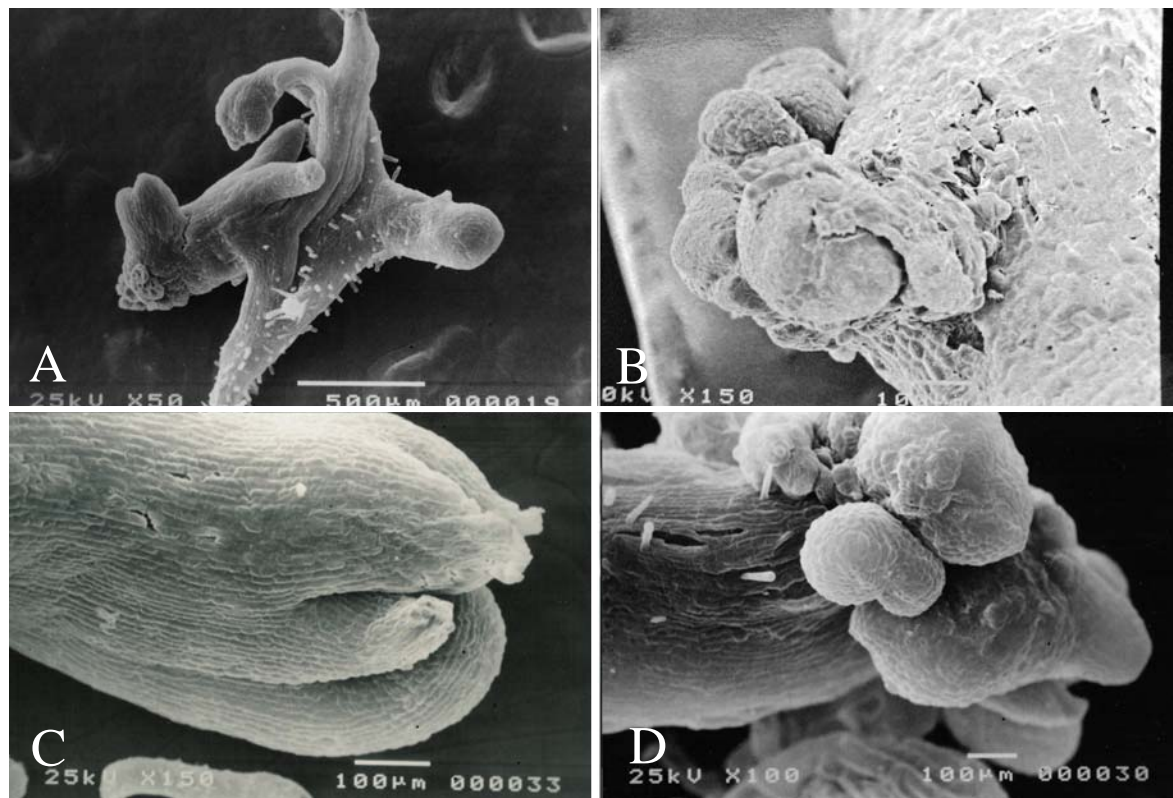


Figura 5.17 Embriogénese repetitiva a partir de embriões precocemente germinados (e.p.g.s) de anormal morfologia. (A) Vários embriões de morfologia anormal que apresentam uma grande superfície de ligação entre si. (B) Embriões globulares secundários produzidos no hipocótilo de um e.p.g. de anormal morfologia. (C) E.p.g.s fundidos entre si num só, semelhantes aos embriões da microfotografia seguinte com embriões secundários. (D) Embriões secundários em fase cordiforme produzidos na zona dos cotilédones de e.p.g.s fundidos entre si.

5.3.6.3 Observação de embriões somáticos em calo embriogénico formado *de novo*

Na Figura 5.18A é apresentada uma microfotografia representativa do início da formação de embriões somáticos em calo embriogénico formado *de novo* a partir de e.p.g.s. Esta figura é a visualização em M.E.V. de material semelhante ao fotografado na Figura 5.15A. Na figura seguinte (Fig. 5.18B) observa-se um grupo de embriões somáticos em fases mais evoluídas. Esta figura exemplifica a forma como os embriões estavam agregados. Nesta figura podem ainda ser observados embriões de morfologia anormal, com os cotilédones fundidos como os apresentados na Figura 5.15C, mas, também, embriões

com outro tipo de anomalia como a presença de mais de dois primórdios de cotilédones. Nas Fig.s 5.18C e 5.18D são apresentadas, em pormenor, duas das fases de histodiferenciação dos embriões somáticos de ulmeiro.

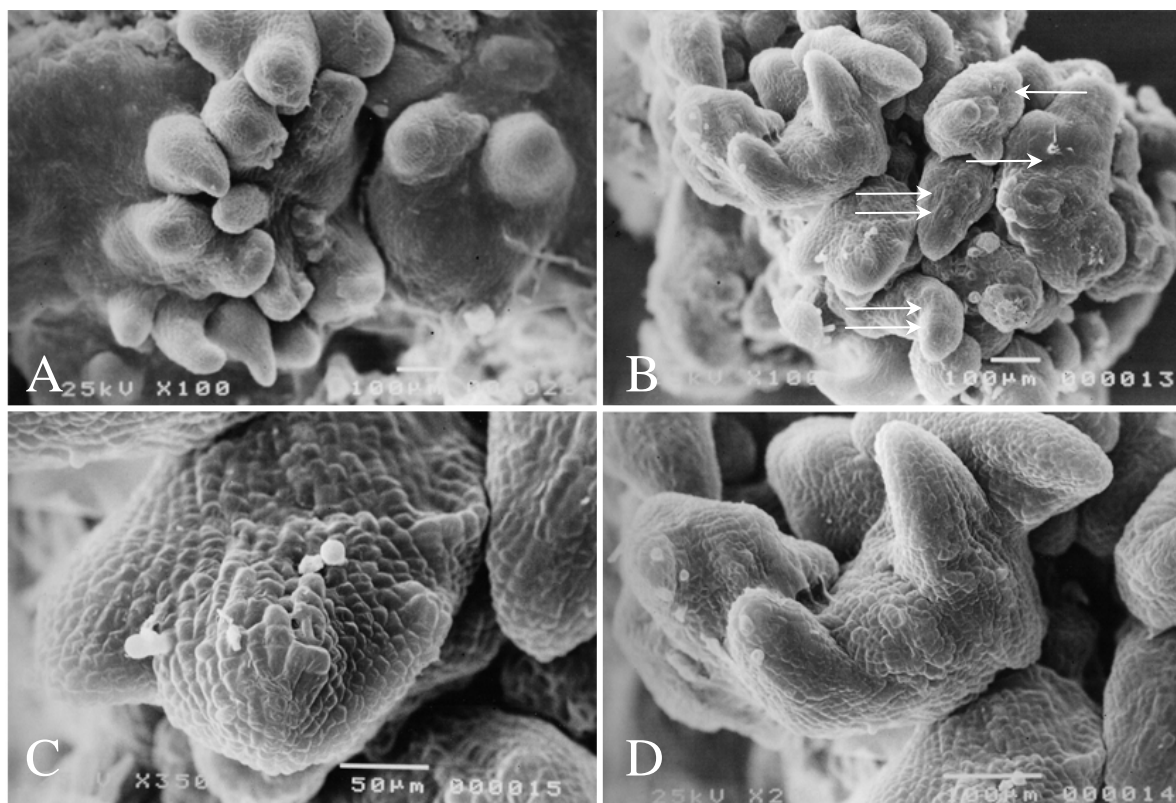


Figura 5.18 Observação de embriões somáticos no calo embriogénico formado *de novo*, a partir de e.p.g.s, em meio basal de MS com 3% de sacarose. (A) Início da diferenciação dos embriões somáticos no calo embriogénico (material em condição semelhante ao apresentado na Figura 5.15A). (B) Grupo de embriões numa fase mais adiantada de diferenciação. Notar a existência de embriões de anormal morfologia, como por exemplo, de embriões com os cotilédones fundidos num só (duplas setas) (ver Figura 5.15C) e de embriões com mais de dois primórdios de cotilédones (setas). (C) Pormenor de um embrião em fase cordiforme e (D) em fase cotiledonar.

5.4 Discussão

5.4.1 Indução de calo embriogénico

5.4.1.1 Influência da origem e do tratamento das folhas

Yeung (1995) defende que a alteração das condições de crescimento das plantas e a sujeição dos explantes a condições de stresse podem ser o estímulo que confere às células a capacidade de produzirem modificações no seu processo de desenvolvimento, tornando-as competentes para os sinais indutores da embriogénese somática. Um determinado número de factores de stresse têm sido enunciados, incluindo o pré-condicionamento da planta-mãe (Yeung 1995).

Neste estudo testou-se a influência, na embriogénese somática, do uso de folhas retiradas de rebentos em duas condições de cultura. O objectivo deste ensaio era determinar se os factores de stresse desencadeados pela extensão da permanência dos rebentos em cultura, de 8 para 16 semanas, promoveriam a aquisição de competência embriogénica por parte das folhas deles retiradas. Este pré-condicionamento dos rebentos dadores incluiu vários factores de stresse, como por exemplo, a diminuição de nutrientes do meio e a sua secura. Devido a este condicionamento, os rebentos mais velhos apresentavam um crescimento mais lento e, embora as folhas próximas do ápice caulinar se apresentassem saudáveis, as folhas mais afastadas mostravam sinais de senescência. Esta condição não permitiu, no entanto, que as folhas destes rebentos adquirissem uma maior competência embriogénica, dado que no meio de indução I6 (Tabela 5.3) foi obtida uma produção de calo embriogénico em 100% das folhas das duas origens. Uma vez que não se registaram diferenças na resposta das folhas, conclui-se que o factor (ou factores) de competência embriogénica estava presente nos dois grupos de folhas. Possivelmente, apesar do condicionamento a que foram sujeitas, as folhas dos rebentos velhos, mais próximas do ápice caulinar, encontravam-se em condições fisiológicas ainda muito semelhantes às das folhas dos rebentos novos.

Neste trabalho escolheu-se como fonte de material as três primeiras folhas de rebentos estabelecidos *in vitro*, dado que o material vegetal mais jovem fornece, de uma

forma geral, melhores resultados na cultura *in vitro* (Vieitz et al. 1987). Para além disso, é frequente referirem em estudos de embriogénese somática, com este tipo de explante, que as folhas mais jovens possuem uma maior capacidade embriogénica. Exemplo disso é um trabalho em kiwi (*Actinidia deliciosa*) em que a idade da folha foi apontada como um dos factores de competência embriogénica. Esta competência foi gradualmente perdida nas folhas que distavam do ápice caulinar (Oliveira 1999). Num outro estudo, este com o género *Populus*, Michler e Bauer (1991) provaram que era necessário usar folhas ainda não totalmente expandidas para produzir calo embriogénico. Estes referiram ainda que, o estado de desenvolvimento das folhas, ou o grau de maturidade das células destas, podia ser um factor crítico na produção do calo embriogénico. No trabalho aqui realizado não se verificaram diferenças na resposta, em relação à posição das três folhas que foram utilizadas, uma vez que houve produção de calo embriogénico em todas as folhas inoculadas no meio I6. No entanto, em trabalhos posteriores, seria interessante estudar a resposta de folhas mais distanciadas do ápice caulinar.

O tamanho do explante e a quantidade de cortes infligidos na folha podem também ser factores determinantes na formação de calo embriogénico. No estudo aqui efectuado não se controlou o tamanho do explante uma vez que cada folha funcionou como tal. No entanto, em termos qualitativos não se verificou qualquer influência do tamanho da folha dado que no meio I6 todas as folhas o produziram (Tabela 5.3).

O mesmo não sucedeu relativamente à quantidade de cortes transversais efectuados em cada folha. Após as primeiras semanas de indução no meio I6, as folhas cultivadas nas condições base de inoculação (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. escuro) ficaram castanhas e produziram calo embriogénico. Por seu lado, as folhas com maior número de cortes (secção 5.3.2.2 (folhas com 6 a 9 cortes e 8 sem. escuro)) mantiveram-se verdes durante mais tempo e, posteriormente, produziram calo não embriogénico em grande quantidade. Em conclusão, o aumento do número de cortes nas folhas levou à produção de calo não embriogénico em vez de calo embriogénico. Este resultado assemelha-se ao obtido por Oliveira e Pais (1992) com folhas de kiwi (*Actinidia deliciosa*). Neste trabalho, as autoras sublinharam a necessidade de usar folhas inteiras, ou cortadas a meio, uma vez que, quando as folhas eram mais cortadas a proliferação de calo não embriogénico estava inversamente correlacionada com a produção de embriões.

Como já foi referido, a indução de embriogénese somática é devida, com frequência, à sujeição dos explantes a situações de stresse (Yeung 1995, Merkle et al. 1995). Em diversos trabalhos, a produção de calo embriogénico e/ou de embriões somáticos foi obtida em situação de stresse provocada pelo envelhecimento da cultura. Este envelhecimento pode ser desencadeado pelo alongamento do período de subcultura ou mesmo pela ausência de subculturas intercalares. Uma das consequências do envelhecimento das culturas é o acastanhamento dos explantes devido à oxidação de compostos fenólicos (George 1993). Estes compostos são oxidados quando as células sofrem algum tipo de ferimento ou quando entram em senescência, como nos casos de falta de subcultura, ficando o tecido castanho ou preto (George 1993). Seguidamente são referidos dois exemplos de sistemas de embriogénese somática em que a formação de embriões só foi verificada após o envelhecimento das culturas e a consequente fenolização dos tecidos. No primeiro, um tecido não embriogénico produzido em folhas de café (*Coffea*) sofreu acastanhamento, junto com a folha, após transferência para um segundo meio, onde permaneceu durante quatro meses, formando posteriormente calo embriogénico (Berthouly e Etienne 1999). No segundo caso, rebentos de plantas do chá (*Camellia sinensis*) permaneceram sem subcultura durante mais de 120 dias e, quatro semanas após subcultura para MS basal, as culturas castanhas deram origem a agregados de embriões globulares (Akula e Akula 1999).

O acastanhamento dos tecidos foi também observado no estudo aqui efectuado. A fenolização dos tecidos foi observada no protocolo base (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. escuro), logo após a inoculação das folhas. Nas outras condições, secção 5.3.2.1 (folhas com 2 a 3 cortes e 8 sem. luz) e secção 5.3.2.2 (folhas com 6 a 9 cortes e 8 sem. escuro) o acastanhamento dos tecidos foi observado, apenas, após as quatro primeiras semanas de cultura. A fenolização surgiu, nestas condições, devido à elevada produção de calo não embriogénico e pela consequente diminuição da razão meio de cultura/material vegetal. Tendo em conta estes resultados, e uma vez que a indução de calo embriogénico foi sempre precedida pela fenolização dos tecidos, pode-se pôr a seguinte hipótese: os compostos fenólicos poderão ter actuado como sinal indutor da produção de calo embriogénico?

A possível intervenção de compostos fenólicos em sistemas de embriogénese somática foi já referida em outros trabalhos. Em feijoa (*Feijoa sellowiana*) a presença de

compostos fenólicos foi descrita em células da periferia de protuberâncias de tecido embriogénico, formado na superfície dos cotilédones inoculados (Canhoto e Cruz 1996). Em mirtilo, células ricas em fenóis surgiram geralmente associadas com as células meristemáticas a partir das quais os embriões se formavam, ou durante as primeiras fases da diferenciação desses embriões (Canhoto et al. 1999). Neste segundo trabalho, os autores chegaram a pôr a hipótese de os fenóis constituírem algum tipo de barreira que isolava os embriões dos tecidos circundantes, uma vez que, em alguns casos, os embriões eram delimitados por células ricas em fenóis. No caso de *U. minor* seria interessante realizar também este tipo de estudo no sentido de esclarecer a intervenção dos compostos fenólicos neste sistema de embriogénese somática.

5.4.1.2 Influência dos reguladores de crescimento

Um dos factores da embriogénese somática, que ainda não está completamente compreendido, é o envolvimento dos reguladores de crescimento na conversão de tecidos somáticos em tecidos embriogénicos (Jiménez 2005). Numa revisão recente, em que foram revistos 124 protocolos de embriogénese somática, a autora referiu que, em mais de 80% dos casos, a indução ocorreu na presença de auxinas e em 65% desses casos a auxina usada foi o 2,4-D (Gaj 2004). Dunstan et al. (1995) referiram, de igual modo, que a indução de embriogénese somática na maior parte das lenhosas tem resultado, predominantemente, do uso de 2,4-D combinado com uma citocinina.

Estas constatações confirmaram-se em *U. minor* uma vez que a adição de 2,4-D mostrou-se indispensável na produção de calo embriogénico e, posteriormente, na diferenciação dos embriões globulares no meio I6.

5.4.1.3 Evolução das culturas de calo embriogénico

Um parâmetro que se mostrou desfavorável no sistema de embriogénese somática aqui implementado, foi a diminuição do número de explantes com características próprias do calo embriogénico devido à proliferação de calo não embriogénico que se sobrepunha

ao primeiro. No entanto, em ensaios em que não foram efectuadas subculturas o calo embriogénico manteve durante mais tempo as suas características e não foi suplantado pelo crescimento de calo não embriogénico. Estes ensaios parecem indicar que a produção de calo não embriogénico terá sido estimulada pelo manuseamento do material, dado que este se formava logo após a subcultura. George (1993) refere que a existência simultânea de dois tipos de calo é comum em culturas de embriogénese somática, sendo frequente a perda do calo competente, devido ao crescimento de calo não embriogénico que se sobrepõe ao anterior.

5.4.2 Produção de embriões globulares

Os embriões somáticos aqui obtidos eram de origem indirecta uma vez que, antes do seu aparecimento, desenvolveu-se um calo embriogénico nas folhas cultivadas. Este resultado está de acordo com o que é referido na literatura, uma vez que, segundo Raemakers et al. (1995), com material vegetativo, o tipo de embriogénese somática mais frequente é de origem indirecta. Na recente revisão de Gaj (2004), apesar de não ser referido o tipo de explante, a autora refere que o modo mais frequente de regeneração de embriões somáticos continua a ser por via indirecta. Em cerca de 70% dos protocolos de diversas espécies a embriogénese foi do tipo indirecto e apenas em 30% desses protocolos houve regeneração de embriões por via directa. Nesses casos de regeneração directa, 8% apresentaram, em simultâneo, a regeneração por modo indirecto.

A formação de embriões globulares só foi iniciada cinco meses após a cultura inicial das folhas. Este período foi relativamente longo, quando comparado com o período geralmente necessário para obter embriões somáticos em explantes não vegetativos. Esta comparação pode ser realizada, por exemplo, no carvalho (*Quercus robur*) com o qual foram obtidos embriões somáticos usando explantes das duas origens. Este período foi de 6 a 10 semanas, quando foram usados embriões zigóticos imaturos (Chalupa 1995) e 3 a 7 meses quando foram usadas partes de germinantes como folhas e segmentos inter-nodais (Cuenca et al. 1999). Para os autores, esta característica estava provavelmente relacionada com o facto de os embriões induzidos nos explantes de folha, e de inter-nó, serem originados por um processo mais difícil de atingir, devido ao estado mais diferenciado do

material de partida. A seguir são apresentados outros casos de embriogénese somática do tipo indirecto, a partir de material vegetativo de lenhosas, que comprovam que o período necessário para a obtenção de embriões é geralmente longo: 1) abacate, *Persea americana*, 3 meses (Cruz-Hernández et al. 1998); 2) sobreiro, *Quercus suber*, 3 meses (Fernández-Guijarro et al. 1995); 3) café, espécies do género *Coffee*, 5 meses (Berthouly e Ettienne 1999); 4) chá, *Camellia sinensis*, 5 meses (Akula e Akula 1999); 5) mogno, *Swietenia macrophylla*, 6 a 8 meses (Maruyama e Ishii 1999); 6) *Clematis integrifolia* x *C. viticella*, 18 meses (Mandegaran e Sieber 2000).

Embora a presença de cinetina não fosse necessária no meio de indução para a produção de calo embriogénico, esta mostrou-se indispensável à diferenciação dos embriões somáticos dado que estes apenas se formaram no meio I6 (2,3 μ M de 2,4-D e 1,1 μ M de cinetina) e não no meio I2 (2,3 μ M de 2,4-D) que apenas possuía 2,4-D (Gráficos 5.2A e B e 5.3A e B). Situações verificadas com espécies do género *Medicago*, para as quais a embriogénese somática também é do tipo indirecto, podem fornecer uma explicação para este resultado. Nos estudos efectuados, os efeitos das citocininas pareceram mostrar que estas não estavam directamente envolvidas na indução de embriogénese, mas sim na estimulação das divisões celulares que precediam a diferenciação dos embriões (Jiménez 2005).

Para além da presença de cinetina no meio de cultura, um outro factor parece ter sido essencial para a diferenciação dos embriões globulares. Esse factor foi a presença de luz. Como demonstrado no ensaio de incubação permanente do calo embriogénico no escuro (secção 5.3.2.3 Influência da incubação permanente do calo embriogénico no escuro), nestas condições o calo embriogénico não formou embriões globulares.

A frequência de indução de embriões globulares no meio I6 variou entre 11,7 a 16,7% (no 5º e 6º mês após o início da indução) e foi bastante razoável quando comparada com as percentagens de indução a partir de material vegetativo de outras lenhosas, como por exemplo: 1) mogno (*Swietenia macrophylla*) 0 a 10% de embriões directos em ápices caulinares (Maruyama e Ishii 1999); 2) carvalho (*Quercus robur*), 4 a 16% de embriões indirectos em folhas de germinantes (Cuenca et al. 1999) e 0,3 a 3,6% de embriões indirectos em folhas de rebentos abrolhados em estufa (Toribio et al. 2004) ; 3) sobreiro (*Quercus suber*) 4% de embriões indirectos em folhas de germinantes (Fernández-Guijarro et al. 1995). Para além disso, com a subcultura destes explantes para meio fresco houve

uma grande proliferação do número de embriões globulares atingindo-se um número médio de 90 embriões globulares por grama do explante formador inicial, com uma percentagem de regeneração bastante elevada, 95%.

A partir dos seis meses, a produção de embriões globulares cessou. Nenhum calo com mais de seis meses foi capaz de produzir novos embriões globulares. Embora parte dos calos ainda mantivessem, após este período, as características típicas de calos embriogénicos, estes acabaram por entrar em senescência e morreram. De forma semelhante, em feijoa (*Feijoa sellowiana*), os explantes iniciais, após darem origem aos embriões somáticos, perderam rapidamente a sua capacidade de regeneração e entraram em senescência, não sendo possível manter em cultura estes calos (Canhoto 1994). Em *Picea abies* a formação de embriões somáticos também foi acompanhada pela morte das células das massas pré-embriogénicas, que davam origem aos embriões, que os autores designaram como “morte programada das células” (von Arnold 2005). Estes resultados parecem mostrar que o “sinal” necessário para a manutenção do potencial embriogénico acaba por se extinguir após a diferenciação dos embriões somáticos.

5.4.3 Histodiferenciação dos embriões globulares

Apesar de diversos factores afectarem a embriogénese somática, nos casos em que a sua indução é devida à adição de auxinas, o posterior desenvolvimento dos embriões é atingido, geralmente, após a remoção ou a diminuição da concentração da auxina do meio de cultura (Jiménez 2005). Este não foi, porém, o caso de *U. minor*.

Das diferentes abordagens realizadas com o intuito de desenvolver os embriões globulares, nenhuma forneceu resultados positivos (Tabela 5.4 e Fig. 5.5A - D). Condições aqui testadas, que são normalmente descritas como impulsionadoras da histodiferenciação dos embriões globulares, não surtiram qualquer efeito nos embriões somáticos de ulmeiro. Em grande parte dos casos, a histodiferenciação para além do estado globular requer a remoção dos reguladores de crescimento associados com a indução e proliferação ou, pelo menos, a redução da sua concentração para níveis que permitam o próprio desenvolvimento do embrião (Merckle et al. 1995). Seguindo esta linha geral, os embriões globulares foram transferidos para meio basal, para meio basal suplementado com carvão

activado (para que houvesse a adsorção dos reguladores de crescimento) e para meio com a concentração de 2,4-D reduzida para 0,5 μM . No entanto, nenhuma destas condições desencadeou a sua histodiferenciação. Para além destas condições, foram testadas outras que não são de utilização tão frequente mas que, apesar disso, têm fornecido resultados positivos em alguns estudos. A elevação da concentração de sacarose do meio de cultura é uma condição referida como favorável ao desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos, uma vez que esta imita o baixo potencial osmótico em que se encontra o embrião zigótico (Monnier 1995). No entanto, em meio basal e em meio com redução da concentração de 2,4-D para 0,5 μM , a duplicação da concentração de sacarose não mostrou grandes diferenças relativamente à utilização de apenas 3% de sacarose. A substituição de 0,5 μM de 2,4-D pela mesma concentração de ANA, a segunda auxina mais utilizada na embriogénese somática de angiospérmicas (Raemakers et al. 1995), também não mostrou qualquer vantagem dando apenas origem a um maior número de raízes adventícias. Finalmente, testou-se a acção isolada de citocininas, uma vez que a adição destas durante a histodiferenciação pode compensar o efeito negativo produzido pela auxina no desenvolvimento do meristema apical caulinar (Merkle et al. 1995) e, para além disso, neste sistema a sua presença mostrou-se indispensável à formação dos embriões somáticos. Mais uma vez, esta tentativa não produziu resultados positivos sendo apenas de realçar o aparecimento de estruturas que, provavelmente, eram rebentos caulinares (dados não apresentados). Merkle et al. (1995) referem que este resultado surge devido à multiplicação do meristema caulinar dos embriões somáticos, dando origem a estruturas que são difíceis de caracterizar como embriogénicas ou organogénicas com base apenas na sua morfologia.

De uma forma geral, nos diferentes meios testados, os embriões globulares formados à superfície do calo embriogénico desdiferenciaram formando calo que rapidamente fenolizou. Um resultado semelhante foi encontrado em culturas embriogénicas de kiwi (*Actinidia chinensis*) (Harada 1975 in Oliveira e Pais 1999). À superfície do calo, produzido a partir de explantes de caule e de raiz, formaram-se embriões que não ultrapassaram o estado globular e que posteriormente desdiferenciaram.

Tendo em conta que: 1) a diminuição da concentração de 2,4-D para 0,5 μM ainda não foi suficiente para desencadear o desenvolvimento dos embriões, provocando o seu arrastamento no estado globular e 2) nos meios em que o 2,4-D estava ausente a histodiferenciação dos embriões também não foi despoletada, uma hipótese a considerar é

a de que, provavelmente, esta poderá necessitar de valores de concentração de 2,4-D inferiores ao testado mas não nulo. Para além desta hipótese, uma outra poderia ser testada em ensaios futuros. Seria interessante efectuar a inoculação das folhas de ulmeiro em meios com concentrações de 2,4-D inferiores à do meio I6 para assim diminuir, desde o início da indução, a concentração da auxina nos tecidos.

No entanto, um ensaio preliminar forneceu resultados que poderão ser promissores no alcance do objectivo pretendido e que redireccionam a via de histodiferenciação dos embriões globulares de ulmeiro. A utilização de um meio com ABA e PEG permitiu obter alguns embriões de boa morfologia, brancos, opacos e volumosos, que perderam o aspecto translúcido dos embriões globulares (Fig. 5.6A). Este ensaio necessita de mais investigação, nomeadamente, na determinação do ou dos factores promotores desta resposta. No entanto, este resultado está em concordância com outros em que ABA e/ou osmótico foram usados no meio de desenvolvimento ou de maturação. Ammirato (1988), num trabalho sobre a função do ABA na regulação da embriogénese somática, refere que este é essencial para o crescimento dos embriões somáticos e que, apenas na sua presença, estes lembram os embriões zigóticos no seu desenvolvimento e estrutura. Hetherington e Quatrano (1991) referem que os níveis de ABA aumentam durante as fases médias da embriogénese zigótica, que serão equivalentes à fase globular dos embriões somáticos (Raemakers et al. 1995). Em sobreiro, a adição de ABA ao meio de cultura foi também recentemente referida como tendo impulsionado a maturação dos embriões somáticos (García-Martín et al. 2005). Nas gimnospérmicas, a adição de ABA e de osmóticos (como por exemplo, sacarose, manitol e PEG) tem sido usada na maturação de coníferas desde há largos anos (Tautorius et al. 1991).

5.4.4 Produção de embriões precocemente germinados (e.p.g.s)

Segundo Yeung (1995), no processo normal de diferenciação do embrião, apenas um pequeno número de células é reconhecido como pertencente ao futuro ápice caulinar, após a diferenciação dos cotilédones. Estas células não se dividem durante a maturação e o ápice caulinar apenas se torna activo durante a germinação. No entanto, Ammirato (1985) referiu que, determinados níveis de citocininas podem inibir parcial ou totalmente o

desenvolvimento dos cotilédones do embrião somático, permitindo assim que o ápice caulinar cresça precocemente formando as primeiras folhas, fazendo com que o embrião somático se pareça mais com um rebento (Ammirato 1985 *in* Vieitez 1995). Possivelmente, foi este o acontecimento que deu origem aos embriões aqui designados por embriões precocemente germinados uma vez que o meio de indução possuía, para além do 2,4-D, a cinetina como citocinina. A transferência de calo embriogénico para meio basal, após quatro meses no meio de indução I6, levou à formação de estruturas embrionárias bipolares (Fig. 5.7A-D), com raiz e dois cotilédones que se assemelhavam a folhas, sendo por isso designadas como embriões precocemente germinados.

Com alguma frequência, surge na literatura a referência à existência de folhas em vez de cotilédones em estruturas embrionárias, mas nem sempre os autores associam a formação destas estruturas ao fenómeno de germinação precoce. Exemplos disto são: os embriões “bud-like” de camélia (*Cammelia japonica*) de Pedroso e Pais (1999); 2) os embriões “bud-like” de mogno (*Swietenia macrophylla*) (Maruyama e Ishii 1999); e 3) os “shooty embryos” com “shooty cotyledons” e fraco desenvolvimento do hipocótilo de um híbrido de espruce (*Picea*) (Roberts et al. 1990).

No único trabalho, de que temos conhecimento, de embriogénese somática no ulmeiro iniciada a partir de embriões zigóticos, Corredoira et al. (2002) apresentaram como embriões, denominados como fase cotiledonar, embriões semelhantes aos embriões precocemente germinados aqui apresentados. A descrição morfológica daqueles embriões coincide com as características dos embriões aqui obtidos. Os autores descreveram estes embriões como sendo estruturas bipolares que exibiam uma morfologia “filamentosa”, com um polo hipocótilo - raiz alongado e com cotilédones verdes parecidos com folhas. Estes referiram ainda que, grande parte daqueles embriões não possuíam um meristema caulinar bem estruturado, ou então, possuíam um meristema caulinar achatado. Estas foram as razões apresentadas pelos autores para o facto de a conversão em plantas ter sido muito esporádica.

A produção de embriões precocemente germinados foi também obtida nos ensaios em que o calo embriogénico foi subcultivado em meio líquido. Após a passagem para meio sólido, alguns dos embriões obtidos mostraram ser muito semelhantes a plântulas recentemente obtidas da germinação de sementes (Fig. 5.8A-F). Seria necessária uma

investigação posterior, com um maior número de réplicas, para determinar se as condições de cultura em meio líquido, que proporcionam um melhor arejamento, uma maior disponibilidade de nutrientes e a diluição de exsudados tóxicos (George 1993), contribuíram para a obtenção deste resultado.

5.4.5 Conversão dos embriões precocemente germinados (e.p.g.s)

Apesar de a conversão dos embriões precocemente germinados ter sido obtida nos dois meios estudados, o meio C1 (Gráfico 5.5) forneceu melhores resultados que foram provavelmente devidos à menor concentração de sacarose deste meio (1% em vez de 2% em C2). Quando os embriões mais longos e com cotilédones bem formados, foram transferidos para este meio, a taxa de conversão elevou-se para 35,9%. Este valor foi bastante superior ao obtido para embriões, com estas características, de algumas das lenhosas anteriormente citadas. Em meio sem reguladores de crescimento, a percentagem de conversão foi inferior a 5% em mogno (Maruyama e Ishii 1999) e igual a 9% em camélia (Vieitez 1995).

5.4.6 Aclimatização das plantas obtidas dos e.p.g.s

As pequenas plantas completas, obtidas a partir dos embriões precocemente germinados, não mostraram diferenças de adaptação, relativamente às plantas controlo, durante o processo de aclimatização. Este resultado traduziu-se numa percentagem estatisticamente semelhante de plantas estabelecidas em vaso para os dois grupos: 39,7% para as plantas provenientes de embriões e 37,5% para as plantas controlo. De igual forma, morfológicamente também não se registaram diferenças entre os dois grupos, sendo as plantas obtidas muito semelhantes entre si, e em relação à planta-mãe. A permanência das plantas no mesmo meio de cultura durante cerca de três meses, foi necessária para provocar nas plantas o endurecimento e engrossamento do caule. Nestas condições, a probabilidade de sucesso na aclimatização era maior, dado que o caule se tornava mais resistente a um ambiente com menor percentagem de humidade relativa e a possíveis contaminações.

Protocolos mais complexos, de transferência por etapas para diferentes condições promotoras do endurecimento e da resistência das plantas ao processo de aclimatização são, frequentemente, referidos (Mathews e Wetzstein 1993; Vlasínová e Havel 1999). Possivelmente, com protocolos deste tipo, a percentagem de plantas aclimatizadas poderia ser mais acentuada, como se verificou na aclimatização de rebentos das culturas de DKW1 que possuíam caules mais grossos e folhas endurecidas.

5.4.7 Embriogénese repetitiva a partir de e.p.g.s

Raemakers et al. (1995), na revisão de embriogénese repetitiva em 65 angiospérmicas dicotiledóneas, referem que a transferência de embriões isolados, ou de agregados de embriões, para o meio de indução primário é suficiente para desencadear a produção de embriões secundários. Ensaio com este intuito, realizados com os embriões globulares obtidos no meio de indução I6 (dados não apresentados) não forneceram este resultado, uma vez que os embriões apenas desdiferenciaram. Pelo contrário a transferência, para meio basal de MS, dos embriões precocemente germinados permitiu a obtenção de novos embriões somáticos de uma forma cíclica. A ontogénese dos embriões somáticos de ulmeiro foi observada em embriões secundários, obtidos de forma directa, sobre partes dos embriões precocemente germinados e em calo embriogénico formado *de novo* a partir dos mesmos embriões. Raemakers et al. 1995 referem que, na maior parte dos trabalhos de embriogénese repetitiva esta é apenas de origem directa. No entanto, neste trabalho os embriões secundários foram também obtidos num calo embriogénico formado *de novo* a partir dos embriões precocemente germinados. Numa publicação de embriogénese somática nas espécies de *Camellia* (Vieitez 1995), a autora refere que, também neste género, existem duas vias de conservação da embriogénese. Uma é a embriogénese repetitiva típica, de origem directa, e, na outra, existe uma fase de calo antes da formação dos novos embriões. Em carvalho (*Quercus robur*), Cuenca et al. (1999) descreveram de igual modo que, para além dos embriões secundários directos, em alguns casos, os embriões primários produziram um calo embriogénico nodular, sendo este também considerado como uma forma de embriogénese repetitiva.

A nível morfológico, os embriões de origem directa eram mais perfeitos (Fig.s 5.13C, 5.13D, 5.13E) e encontravam-se mais separados que os obtidos por intervenção do calo embriogénico formado *de novo*. No calo embriogénico, a visualização dos embriões tornava-se mais difícil devido à sua formação em agregados e estes embriões apresentavam, com frequência, bastantes malformações (Fig.s 5.15A–5.15D). Embora os embriões secundários de origem directa tenham ocorrido esporadicamente, foi a partir destes que se tornou possível visualizar melhor as diferentes fases da ontogénese dos embriões somáticos de ulmeiro.

O calo embriogénico formado *de novo* foi mantido em cultura durante três anos. As subculturas foram realizadas em ciclos de três meses, uma vez que com subculturas de período mais curto os embriões não se diferenciavam e havia apenas proliferação do calo embriogénico. Mais uma vez, verificou-se que quando as subculturas eram frequentes, a par com o calo embriogénico desenvolvia-se calo não embriogénico que progressivamente cobria o primeiro. Estes resultados podiam, no entanto, ser contrariados se as subculturas fossem realizadas para um meio com menor concentração de nutrientes e de sacarose. A necessidade de subcultura alternada para um meio mais pobre em nutrientes foi também referida para sobreiro (*Quercus suber*) (Fernández-Guijarro 1995). Naquele caso, a contínua subcultura de agregados de embriões no meio de proliferação levou a uma menor produção de embriões destacáveis, sem malformação. Possivelmente, a deficiência de nutrientes, provocada pelo alargamento do período de manutenção do calo embriogénico no mesmo meio de cultura, pode interferir na diferenciação dos embriões somáticos.

Tanto no meio de proliferação, como no meio de conversão, os embriões desenvolveram as duas primeiras folhas e prosseguiram o seu alongamento sem passarem por um processo de maturação. Este acontecimento não é de surpreender porque no campo foi constatado que a germinação das sementes pode verificar-se imediatamente após a sua dispersão, se houver no solo alguma humidade. Michler (1995) refere, igualmente, que para muitas espécies do género *Populus*, a maturação das sementes dá-se em presença de um elevado conteúdo em água e a germinação também ocorre imediatamente após a dispersão.

Os embriões provenientes do calo embriogénico formado *de novo* foram transferidos para o meio de conversão C1 e deram origem a plantas em tudo semelhantes às obtidas a partir dos embriões precocemente germinados.

O número médio de embriões produzidos por grama de calo embriogénico formado *de novo* foi determinado registando o peso inicial dos explantes e contabilizando depois o número de embriões de cada explante. O número estabelecido atingiu uma média de 423 embriões somáticos por grama de tecido. Esta quantidade de embriões sofreu, no entanto, uma acentuada redução no momento da transferência para os meios de conversão. Devido à sua fragilidade e à forma como se encontravam unidos uns aos outros, muitos deles ficavam danificados.

5.5 Conclusão

A implementação de um sistema de embriogénese somática que torne possível a propagação clonal a partir de indivíduos adultos, permanece um objectivo a atingir para a maioria das espécies lenhosas (Merckle e Dean 2000; Toribio et al. 2005). Este objectivo foi no entanto atingido em *U. minor*. Neste trabalho obtiveram-se embriões somáticos utilizando as folhas mais jovens de rebentos estabelecidos *in vitro*, a partir de material adulto.

O uso de folhas na indução de embriogénese somática de espécies lenhosas não é muito comum. Os tipos de explante usados com mais frequência são derivados de tecidos muito juvenis, em termos de desenvolvimento, como embriões zigóticos e órgãos provenientes da germinação de sementes, como hipocótilos e cotilédones (Dunstan et al. 1995). De facto, grande parte dos trabalhos de embriogénese somática em lenhosas descrevem um processo de clonagem do embrião zigótico, sendo o produto da multiplicação deste de valor genético não provado. Contrariamente, a propagação a partir de material adulto fornece uma inegável importância em programas de melhoramento vegetal.

Neste trabalho implementou-se um sistema de regeneração de embriões somáticos de ulmeiro, tendo em conta protocolos desenvolvidos para outras lenhosas, uma vez que, já durante a redacção desta tese, foi publicado um outro trabalho de embriogénese somática no género *Ulmus*. Os autores estabeleceram um sistema de embriogénese somática usando como fonte de material embriões zigóticos, colhidos seis semanas após a floração, porque não conseguiram estabelecer este sistema a partir de material vegetativo (Corredoira et al.

2002). A indução de culturas embriogénicas a partir de embriões zigóticos traduz-se, de uma forma geral, numa produção directa e mais rápida de embriões somáticos do que a partir de material vegetativo. No entanto, aquele sistema não tinha essas características. Os embriões somáticos foram obtidos por via indirecta, após um período de indução que chegou a atingir os seis meses. Este período de indução teve uma duração semelhante à do período necessário para a indução de embriões somáticos a partir de folhas, no trabalho aqui apresentado. De igual forma, a produção de calo embriogénico também necessitou da adição de fitoreguladores. A adicionar àqueles factores, houve a necessidade de um controlo estreito do estado de desenvolvimento do embrião zigótico e a limitação da iniciação das culturas a uma única altura do ano.

Tendo todos estes factores em conta, a implementação desta via de regeneração a partir de uma fonte de material de características conhecidas, que está sempre disponível e em condições de assepsia, torna-se uma inegável mais valia. Esta vantagem será ainda mais importante quando o objectivo for o melhoramento do ulmeiro usando a embriogénese somática como sistema de regeneração de plantas.

Em conclusão este é o primeiro trabalho que reporta a obtenção de embriões somáticos, de uma forma reprodutível, a partir de material somático de um ulmeiro adulto. As frequências de regeneração, de conversão e de aclimatização obtidas são semelhantes aos valores referidos para outras lenhosas. Assim sendo, esta via de regeneração de plantas poderá ser integrada em programas de melhoramento do ulmeiro, nos quais se devem preservar as características da população nativa que se pretende reintroduzir.

Referências bibliográficas

- Akula A, Akula C (1999)** Somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 239-257
- Andrade GM, Merkle SA (2005)** Enhancement of American chestnut somatic seedling production. Plant Cell Reports 24: 326-334
- Ammirato PV (1988)** Role of ABA in regulation of somatic embryogenesis. HortScience 23: 520

- Arrilaga I, Tobolski JJ, Merkle SA (1994)** Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Plant Cell Reports 13:171-175
- Attree SM, Moore D, Sawhney VK, Fowke LC (1991)** Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos: effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. Annals of Botany 68: 519-525
- Augustine AC, D'Souza L (1999)** Somatic embryogenesis in *Gnetum ula*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 79-94
- Baker CM, Wetzstein HY (1998)** Leaflet development, induction time, and medium influence somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Reports 17: 925-929
- Berthouly M, Etienne H (1999)** Somatic embryogenesis of Coffee. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 259-287
- Canhoto JM (1994)** *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae): Estudos Sobre Embriogénese Somática e Outros Tipos de Morfogénese. Tese de doutoramento, Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra
- Canhoto JM, Cruz GS (1996)** Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). Protoplasma 191: 34-45
- Canhoto JM, Lopes ML, Cruz GS (1999)** Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 13-21
- Canhoto JM, Mesquita JF, Cruz GS (1996)** Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. Annals of Botany 78: 513-521
- Chalupa V (1995)** Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 67-87
- Chen MH, Chen CC, Wang DN, Chen FD (1991)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured in vitro. Canadian Journal of Botany 69: 1913-1918
- Corredoira E, Vieitez AM, Ballester A (2002)** Somatic embryogenesis in elm. Annals of Botany 89: 637-644
- Cruz-Hernández A, Witjaksono Litz RE, Gomez Lim M (1998)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Reports 17: 497-503
- Cuenca B, San-José MC, Martínez MT, Ballester A, Vieitez AM (1999)** Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Reports 18: 538-543

- Driver JA, Kuniyuki AH (1984)** In vitro propagation of paradox walnut rootstock. *HortScience* 19: 507-509
- Druart P (1999)** Somatic embryogenesis in *Prunus* species. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 215-135
- Dunstan DI, Tautorius TE, Thorpe TA (1995)** Somatic embryogenesis in woody plants. In: Thorpe TA (ed.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 471-538
- Dytham C (1999)** *Choosing and Using Statistics, A Biologist's Guide*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 215 pp.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003)** Transition of somatic plant cells to an embryogenic state (review). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228
- Fernández-Guijarro B, Celestino C, Toribio M (1995)** Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41: 99-106
- Gaj MD (2004)** Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27-47
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968)** Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151
- García-Martín G, Manzanera JA, González-Benito ME (2005)** Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 171-177
- George EF (1993)** Plant tissue culture techniques. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd., pp. 3-36
- Giri CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004)** Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees* 18: 115-135
- Halperin W (1995)** In vitro embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe TA (ed.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 1-16
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (1997)** Principles of tissue culture for micropropagation. In: *Plant Propagation: Principles and Practices* (6th ed.). International Edition, pp. 549-589
- Hetherington AM, Quatrano RS (1991)** Mechanism of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytologist* 119: 9-32

- Hutchinson J (1973)** The Families of Flowering Plants (arranged according to a new system based on their probable phylogeny). Third edition. Oxford University Press
- Ibaraki Y, Kurata K (2001)** Automation of somatic embryo production (review). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 179-199
- Jayasankar S, Gray DJ, Litz RE (1999)** High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. *Plant Cell Reports* 18: 533-537
- Jiménez VM (2005)** Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis (review). *Plant Growth Regulation* 47: 91-110
- Maheswaran G, Williams EG (1985)** Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* in vitro. *Annals of Botany* 56: 619-630
- Mandegaran Z, Sieber VK (2000)** Somatic embryogenesis in *Clematis integrifolia* x *C. viticella*.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 163-165
- Maruyama E, Ishii K (1999)** Somatic embryogenesis in big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King). In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 45-62
- Mathews H, Wetzstein HY (1993)** A revised protocol for efficient regeneration of somatic embryos and acclimatization of plantlets in pecan, *Carya illinoensis*. *Plant Science* 91: 103-108
- Merkle SA, Dean JFD (2000)** Forest tree biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 298-302
- Merkle SA, Nairn CJ (2005)** Hardwood tree biotechnology. In *Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 41: 602-619
- Merckle SA, Parrot WA, Flinn BS (1995)** Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 155-203
- Michler CH (1995)** Somatic embryogenesis in *Populus* spp. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 89-97
- Michler CH, Bauer EO (1991)** High frequency somatic embryogenesis from leaf tissue of *Populus* spp. *Plant Science* 77: 111-118
- Minocha SC, Minocha R (1995)** Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 9-22
- Misra S (1995)** Molecular analysis of zigotic and somatic conifer embryos. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 119-142

- Monnier M (1995)** Culture of zygotic embryos. In: Thorpe TA (ed.) In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 117-153
- Moreira I (1999)** Histologia Vegetal (3ª ed.). Didáctica Editora, Lisboa, 294 pp.
- Morel G, Wetmore RH (1951)** Fern callus tissue culture. American Journal of Botany 38: 141-143
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Nomura K, Komamine A (1995)** Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed.) In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 249-265
- Oliveira MM (1999)** Somatic embryogenesis in kiwifruit (*Actinidia* sp.). In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 181-195
- Oliveira MM, Pais MS (1992)** Somatic embryogenesis in leaves and leaf-derived protoplasts of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit). Plant Cell Reports 11: 314-317
- Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005)** Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 287-300
- Pedroso MC, Pais MS (1999)** Direct somatic embryogenesis from leaves of *Cammelia japonica*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 163-178
- Pinto G (2002)** Embriogénese somática e conversão de embriões em plantas de *Quercus suber* L. Dissertação de Mestrado em Melhoramento Genético de Espécies Agrícolas e Florestais. Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro. Vila Real
- Preece JE, Bates S (1995)** Somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.). In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 311-325
- Raemakers CJJM, Jacobson E, Visser RGF (1995)** Secondary somatic embryogenesis and application in plant breeding. Euphytica 81: 93-107
- Roberts DR, Flinn BS, Webb DT, Webster FB, Sutton BCS (1990)** Abscicic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. Physiologia Plantarum 78: 355-360
- Sita GL (1999)** Somatic embryogenesis in rosewood and other indian trees legumes. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 95-112

- Tautorus TE, Fowke LC, Dunstan DI (1991)** Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany* 69: 1873-1899
- Toribio M, Fernández C, Celestino C, Martínez MT, San-José MC, Vieitez AM (2004)** Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 283-287
- Tzfira T, Zuker A, Altman A (1998)** Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests (Review). *Tibtech* 16: 439-446
- Vasil V, Vasil IK (1981)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Annals of Botany* 47: 669-678
- Vieitez AM (1995)** Somatic embryogenesis in *Camellia* spp. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 235-276
- Vieitez AM, Ballester A, Vieitez ML, San-José MC, Vieitez FJ, Vieitez E (1987)** Propagation de Plantas Leñosas por Cultivo In Vitro. Diputacion Provincial de Pontevedra, 97 pp.
- Vlasínová H, Havel L (1999)** Continuous somatic embryogenesis in Japanese maple (*Acer palmatum* Thunb.). *Journal of Plant Physiology* 154: 212-218
- von Arnold S, Bozhkov P, Clapham D, Dyachok J, Filonova L, Högborg K-A, Ingouff M, Wiweger M (2005)** Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 323-329
- Ziv M (2005)** Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 277-285
- Watt MP, Blakeway FC, Termignoni R, Jain SM (1999)** Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton JR (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 63-78
- Williams EG, Maheswaran G (1986)** Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462
- Yeung EC (1995)** Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 205-247

Conclusões gerais

O objectivo desta tese foi a implementação de protocolos eficientes para a cultura *in vitro* de *Ulmus minor* Mill.

O trabalho foi iniciado com a produção de rebentos a partir de segmentos nodais obtidos de material adulto, colhido no campo. Mostrou-se que a produção de rebentos a partir de árvores com DAP acima de 20 cm é possível. Dos dois meios testados para a proliferação de rebentos, o meio com a composição de Driver e Kuniyuki (1984), aqui designado como DKW1 (com 4,4 μM BAP + 0,05 μM AIB), forneceu os melhores resultados. A aclimatização directa de rebentos foi realizada com sucesso e provou-se que não é necessário efectuar o enraizamento *in vitro* das plantas. Tanto as plantas provenientes da aclimatização directa como as enraizadas *in vitro* sobreviveram quando transferidas para o campo. Algum tempo após a introdução *in vitro*, o material mostrou possuir uma maior capacidade de proliferação de rebentos que, provavelmente, se deveu ao seu rejuvenescimento. Os rebentos assim estabelecidos serviram como fonte de material para quase todo o trabalho posterior.

A regeneração de rebentos por organogénese foi testada usando calo e folhas. Das várias combinações de reguladores de crescimento testadas na produção de calo a partir de folhas, tendo o meio MS como base salina, a utilização de 2,5 μM de 2,4-D e 1,0 μM de Kn do meio MS3 forneceu os melhores resultados. A regeneração de rebentos a partir de calo foi conseguida após a transferência do calo para meio com 1 mg/l de BAP (DKW1BAP). Os rebentos assim obtidos, alongaram e enraizaram dando origem a plantas normais. Neste ensaio foram ainda utilizadas folhas *in vitro* com o intuito de produzir nestas rebentos via organogénese directa. Este objectivo foi atingido mas, a par com os rebentos com esta origem, foram também obtidos rebentos por organogénese indirecta. Este protocolo poderá ser aperfeiçoado no sentido de promover apenas a formação de rebentos por organogénese directa mas, apesar disso, permitiu a obtenção de um elevado número de rebentos.

No isolamento de protoplastos a partir de calo os rendimentos obtidos foram semelhantes aos publicados para os híbridos Americanos do género *Ulmus*. Apesar de não se ter efectuado qualquer tentativa de cultura dos protoplastos de calo os rendimentos alcançados possibilitam essa realização.

Para além do calo, foram utilizadas folhas *in vitro* e de estufa para o isolamento de protoplastos. Para as folhas, foram testadas várias combinações/concentrações de enzimas digestivas que tiveram como factor comum a presença de celulase Onozuka RS ou de celulase Onozuka R10. Estatisticamente, não foram obtidas diferenças significativas entre os valores médios dos vários isolamentos que foram efectuados com cada uma destas celulasas, mas a celulase Onozuka RS mostrou resultados significativamente superiores à celulase Onozuka R10.

Em relação à cultura de protoplastos de folha, a utilização inicial do meio KM8p de Kao e Michayluk (1975) não forneceu resultados positivos. Com modificações ao nível da concentração de manitol e de sacarose, o meio KM8p permitiu a obtenção de colónias e de microcalos a partir de protoplastos de folha de ulmeiro. Dos três métodos de cultura que foram testados, apenas o método de cultura em gotas de agarose favoreceu a formação de microcalos. Este método de cultura apenas proporcionou resultados positivos quando a densidade dos protoplastos cultivados foi igual a 2×10^5 pp/ml. Como nos outros métodos de cultura foi utilizada uma densidade inferior, pode pôr-se a hipótese de ser esta a razão do insucesso nestes métodos. Uma eficiência de plaqueamento de 2,7% foi obtida dez semanas após o início da cultura. Nesta altura os microcalos de maior dimensão atingiam entre 0,5-1 mm de diâmetro e foram transferidos para meio sólido. A colocação destes microcalos no meio de indução de embriogénese somática I6, que foi testado para folhas, deu origem a um calo embriogénico em tudo semelhante ao produzido a partir daquela fonte de material.

A propagação clonal do ulmeiro via embriogénese somática foi alcançada neste trabalho, pela primeira vez. Em folhas de rebentos estabelecidos *in vitro* foi produzido calo embriogénico em dois de oito meios testados para a sua indução. Esses meios, I2 e I6, tinham como base o meio MS e possuíam como reguladores de crescimento $2,3 \mu\text{M}$ de 2,4-D em I2 e $2,3 \mu\text{M}$ de 2,4-D mais $1,1 \mu\text{M}$ de Kn no caso do I6. Entre os cinco e os seis meses após a indução, no calo embriogénico formado em I6 verificou-se a produção de

embriões globulares. O número de embriões globulares produzidos por cada calo embriogénico foi muito variável, entre 1 a 60, e o seu tamanho variou entre 200 e 600 μm .

Enquanto a manutenção do calo embriogénico no meio de indução deu origem aos embriões globulares a transferência deste calo para meio basal de MS com 3% de sacarose, deu origem a um outro tipo de embrião que foi designado como embrião precocemente germinado (e.p.g.), porque era formado por dois cotilédones semelhantes a folhas e uma raiz alongada. A conversão dos embriões precocemente germinados foi facilmente atingida em dois meios com metade da concentração salina do MS e baixa concentração de sacarose. No meio C1, com 1% de sacarose, foi obtida uma percentagem de conversão igual a 35,9%. No processo de aclimatização não se registaram diferenças, entre as plantas provenientes de embriões e as plantas controlo oriundas de DKW1.

A partir dos embriões precocemente germinados foi desencadeado o processo de embriogénese repetitiva, usando, principalmente, os embriões que apresentavam anormal morfologia. Com a colocação destes embriões em meio basal de MS com 3% de sacarose, foram obtidas duas respostas. A produção de um calo embriogénico formado *de novo*, que deu posteriormente origem a novos embriões, e a formação directa de novos embriões sobre os embriões precocemente germinados. Foi a partir dos embriões formados via embriogénese repetitiva que foi possível visualizar as diferentes fases da ontogénese dos embriões somáticos de ulmeiro. As culturas do calo embriogénico formado *de novo* foram mantidas durante três anos, havendo nestas uma proliferação contínua de embriões e de calo embriogénico. Neste calo embriogénico formado *de novo* foi estimado um número médio de produção de embriões igual a 423 embriões somáticos por grama. Estes embriões foram convertidos e as plantas produzidas por esta via embriogénica mostraram-se semelhantes às obtidas dos embriões precocemente germinados.

O esquema das páginas seguintes apresenta, de forma resumida, as diferentes etapas dos protocolos que foram estabelecidos:

Anexo

1) Todos os procedimentos deste trabalho foram realizados em rigorosas condições de assepsia, utilizando câmaras de fluxo laminar horizontal.

2) Os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C e a 1,2 kg/cm² de pressão, durante 20 min. Os recipientes em vidro foram autoclavados durante 30 min. e a distribuição dos meios de cultura foi realizada após a autoclavagem.

3) Nas situações em que a esterilização não pôde ser realizada em autoclave, o modo de esterilização foi referido no texto.

4) Os produtos químicos utilizados durante o trabalho foram adquiridos às empresas Duchefa Biochemicals® (Netherlands) e Sigma® (Portugal).

5) A seguir apresenta-se a composição salina e de vitaminas dos principais meios de cultura usados durante o trabalho:

DKW (Driver e Kuniyuki 1984)

Micronutrientes

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	mg/l
FeNaEDTA	44,63	
H ₃ BO ₃	4,80	
MnSO ₄ .H ₂ O	33,80	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39	
ZnNO ₃ .6H ₂ O	17,00	

Macronutrientes

CaCl ₂	112,50
Ca(NO ₃) ₂	1367,00
KH ₂ PO ₄	265,00
K ₂ SO ₄	1559,00
MgSO ₄	361,49
NH ₄ NO ₃	1416,00

Vitaminas

Glicina	2,00
mio-Inositol	100,00
Ácido nicotínico	1,00
Tiamina HCl	2,00

MS (Murashige e Skoog 1962)**Micronutrientes**

CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	

Macronutrientes

CaCl ₂	332,02
KH ₂ PO ₄	170,00
KNO ₃	1900,00
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	1650,00

Vitaminas

Glicina	2,00
mio-Inositol	100,00
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina HCl	0,50
Tiamina HCl	0,10

B5 (Gamborg et al. 1968)**Micronutrientes**

CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	3,00	
KI	0,75	
MnSO ₄ .H ₂ O	10,00	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,00	

Macronutrientes

CaCl ₂	113,23
KNO ₃	2500,00
MgSO ₄	121,56
NaH ₂ PO ₄	130,44
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00

Vitaminas

mio-Inositol	100,00
Ácido nicotínico	1,00
Piridoxina HCl	1,00
Tiamina HCl	10,00